



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015002132-1 A2

(22) Data do Depósito: 29/01/2015

(43) Data da Publicação: 02/08/2016



(54) Título: COMPOSTO, PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPOSTO, USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OU DE DOENÇA NEURODEGENERATIVA, FORMA DE DOSAGEM ORAL E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

(51) Int. Cl.: C07D 401/12; C07D 413/12; C07D 221/00; C07D 227/00; A61K 31/445; (...)

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ, FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG

(72) Inventor(es): CLÁUDIO VIEGAS JUNIOR, ELIEZER DE JESUS LACERDA BARREIRO, MIGUEL DIVINO DA ROCHA, FLÁVIA PEREIRA DIAS VIEGAS

(74) Procurador(es): SORAYA HELENA COELHO LEITE

(57) Resumo: COMPOSTO, PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPOSTO, Uso, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OU DE DOENÇA NEURODEGENERATIVA, FORMA DE DOSAGEM ÜRAL E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE. A presente invenção descreve um novo composto, seu processo de síntese e os usos deste composto, bem como uma composição farmacêutica contendo o referido composto. Especificamente, a presente invenção revela um composto de acordo com a fórmula I, seu processo de síntese e composições compreendendo o referido composto. Adicionalmente, a presente invenção também descreve o uso do composto para fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de doenças neurodegenerativas, de inflamações, além de composições anticolinesterásicas. Ainda, a presente invenção descreve métodos de tratamento envolvendo a administração do referido composto.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSTO, PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPOSTO, USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OU DE DOENÇA NEURODEGENERATIVA, FORMA DE DOSAGEM ORAL E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se situa nos campos da Química Farmacêutica e da Farmacologia. Mais especificamente, a presente invenção descreve um novo composto, seu processo de síntese e os usos deste composto e uma composição farmacêutica contendo o referido composto.

Antecedentes da Invenção

[0002] A forma de demência mais comum em pessoas acima de 65 anos é a doença de Alzheimer (DA)¹. A DA é um processo neurodegenerativo progressivo e está relacionada com um conjunto de fatores fisiopatológicos tais como a idade, o surgimento de depósitos de placas senis (agregados da proteína p-amiloide) e de emaranhados neurofibrilares no cérebro, perda de neurônios colinérgicos, principalmente da acetilcolina (ACh)⁴ e da instalação de um processo neuro-inflamatório.

[0003] O paciente com DA sofre com uma série de sintomas que estão relacionados com a perda de neurônios colinérgicos no sistema nervoso central (SNC), tais como a diminuição progressiva da memória e das habilidades cognitivas, desorientação, falta de atenção, comprometimento da aptidão linguística e depressão^{5,6}.

[0004] Estima-se que 35,6 milhões de pessoas no mundo sofrem da DA e que no Brasil existem cerca de 1,2 milhão de portadores. Devido ao envelhecimento da população global, espera-se que esses números aumentem acentuadamente, sendo estimado que em 2030 sejam 65,7 milhões e, em 2050, 115,4 milhões de portadores da DA. Espera-se também que dois terços dessa população sejam de países em desenvolvimento.⁷

[0005] Ao comparar os dados dos censos demográficos de 1960 a 2010, o número de pessoas com idade superior a 60 anos praticamente triplicou ao longo desses 50 anos e, atualmente, representa 10,8% da população brasileira, totalizando 20,5 milhões de pessoas.⁸ No mundo, segundo o Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA, na sigla em inglês), espera-se que a população de pessoas acima de 60 anos aumente em 200 milhões nos próximos 10 anos e, em 2050, serão 2 bilhões de idosos representando 20% da população mundial.⁹ A idade é o principal fator de risco da DA, uma vez que na maioria das pessoas os sintomas aparecem após os 60 anos. A proporção de idosos entre os 65 e 74 anos de idade com DA é de 5% e quase a metade das pessoas com 85 anos ou mais são portadoras da doença.¹⁰

[0006] Aspectos fisiopatológicos e formas de tratamento da DA

[0007] O envelhecimento cerebral e a perda localizada de neurônios, principalmente do hipocampo e do pró-encéfalo basal, estão diretamente relacionados com a DA.¹¹ Histopatologicamente a DA caracteriza-se pelo depósito extraneuronal de placas senis e depósito intraneuronal de emaranhados neurofibrilares, acompanhada por morte massiva de neurônios.¹² O principal componente das placas senis é o peptídeo p-amiloide (β A)¹³⁻¹⁴ e é o produzido pela ação de endoproteases (secretases) da membrana glicoprotéica, a partir da proteína precursora amiloide (APP), codificada por um gene presente no cromossomo 21.¹⁵⁻¹⁷ Fragmentos do β A formam agregados fibrilares não-covalentes que depositam-se no tecido neuronal e estão relacionados à neurotoxicidade da DA.¹⁸⁻²⁰ As secretases são enzimas responsáveis pelo processo proteolítico normal da APP, levando à formação de fragmentos β A e, dependendo do sítio de proteólise, são classificadas em α -, β - e γ - secretases. As α -secretases são, provavelmente, fixadas na membrana plasmática e clivam a APP entre os resíduos 16 e 17 da sequência do β A, gerando fragmentos extracelulares solúveis conhecidos como sAPP α , que são normalmente fagocitados pelas micróglia e eliminados. Portanto, a quebra da APP por α -secretases inibe a formação de depósitos de β A e constitui a maior

rota fisiológica de quebra da APP.¹⁸⁻²² Por outro lado, quando a proteólise da APP ocorre por ação de α e γ -secretases, entre os resíduos de aminoácidos 596-597 e 637-639, respectivamente, ocorre a liberação de fragmentos insolúveis de β A.^{22,23} A APP pode ser quebrada pelas γ -secretases em quatro posições diferentes, originando peptídeos β A que variam de 39 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo o resíduo β A₁₋₄₀ formado majoritariamente. Resíduos β A₁₋₄₂ e β A₁₋₄₃ são minoritários, porém são as espécies mais encontradas em placas cerebrais²⁴ e estão relacionados à progressão da DA.²⁵

[0008] A função da proteína Tau é estabilizar os microtúbulos dos axônios, estruturas responsáveis pela formação e manutenção dos contatos interneuronais. Ao se acumular intracelularmente, devido a um processo de hiperfosforilação de origem pouco esclarecida, a proteína Tau gera os emaranhados neurofibrilares.²⁶

[0009] Vários estudos demonstraram que a DA está relacionada com a redução de neurotransmissores como dopamina, serotonina, noradrenalina, glutamato, substância P e principalmente da acetilcolina (ACh). O déficit colinérgico pode ser retardado ou amenizado pela inibição parcial da atividade da acetilcolinesterase (AChE), estratégia conhecida como "Hipótese colinérgica", que inspirou os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da DA, além de outros em estágios pré-clínicos. Entretanto, estes fármacos atuam no restabelecimento da função colinérgica, aliviando os sintomas e retardando a evolução da doença, garantindo assim, uma melhor qualidade de vida ao paciente, porém, sem oferecer a cura efetiva.²⁵

[0010] Atualmente existem também muitas pesquisas na busca por novos fármacos que abordam a "Hipótese Amiloide", que é baseada na intervenção da formação dos fragmentos insolúveis de β -amiloide e, assim, na formação e deposição das placas amiloides.²⁵

[0011] Inibidores de AChE e o arsenal terapêutico disponível ao tratamento da DA

[0012] A maioria das novas entidades químicas (NEQs) desenvolvidas para o tratamento da DA atua inibindo a atividade da enzima AChE, responsável pela hidrólise de acetilcolina (ACh) em colina e acetato.^{27,28}

[0013] Os inibidores de acetilcolinesterase (IACHEs) são classificados de acordo com a estrutura e com o mecanismo de ação em:

- Irreversíveis: possuem ligantes que interagem de maneira reversível com a enzima, em uma região próxima ao sítio catalítico;
- Pseudo-irreversíveis: incluem a classe dos carbamatos que formam um complexo carbamoylante com um resíduo de serina na tríade catalítica da AChE e possuem como protótipo a fisostigmina, produto natural cuja estrutura básica levou ao desenvolvimento da rivastigmina;
- Reversíveis: possuem ligantes que interagem de maneira reversível com a enzima, em uma região próxima ao sítio catalítico, como acontece, por exemplo, com as aminoacridinas (p.e. tacrina), alguns alcaloides (p.e. galantamina) e as W-benzilpiperidinas (p.e. donepezil).²⁹

[0014] O primeiro fármaco comercial para o tratamento da DA foi a tacrina (THA, Cognex®, 1), aprovada em 1993. Seu mecanismo de ação está baseado na inibição tanto da AChE como da butirilcolinesterase (BuChE), efetiva em pacientes com DA de intensidade leve a moderada. Entretanto, após pouco tempo de comercialização, teve seu uso restrito em alguns países devido a sua toxicidade hepática e baixa biodisponibilidade, sendo recomendada apenas para pacientes que não respondem ou toleram os demais medicamentos disponíveis. Apesar disso, sua estrutura tem sido amplamente utilizada no planejamento de muitos outros análogos ativos, com diferentes índices de seletividade e menor toxicidade, a exemplo das huprinas, bis-tacrinas, tacripirinas dentre outros derivados de estrutura híbrida.³⁰⁻⁵⁴

[0015] Atualmente, existem somente 4 fármacos aprovados e disponíveis comercialmente para o tratamento da DA: donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®), galantamina (Reminyl®) e memantina (Namenda®).

[0016] A galantamina é um produto natural que atua como agonista de receptores nicotínicos e tem sido bastante estudada como protótipo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anticolinesterásicos.⁵⁵ Seu efeito terapêutico é consequência de um mecanismo de ação duplo: inibindo a AChE e modulando o receptor nicotínico pré-sináptico, promovendo assim uma maior liberação de ACh na fenda sináptica.⁵⁶

[0017] A rivastigmina é um inibidor reversível de colinesterases, planejado por modificação estrutural da fisostigmina, capaz de inibir tanto a AChE como a BuChE. Sua utilização é indicada para o tratamento dos estágios leve a moderado da DA. Também é prescrita na terapêutica da doença de Parkinson (DP), sendo que seu uso oral para a DA foi aprovado 2000 e, somente em 2006, para o tratamento da DP.⁵⁷⁻⁵⁸

[0018] Dentre os fármacos disponíveis atualmente, a memantina (5) foi o último fármaco aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 2006, sendo também o único que não atua na inibição da AChE. A memantina atua como antagonista de receptores de glutamato do tipo W-metil-D-aspartato (NMDA), evitando um influxo excessivo de cálcio (Ca^{2+}).⁵⁹ Nas sinapses, após o estímulo do neurônio pré-sináptico, ocorre a liberação de glutamato, que liga-se aos receptores NMDA e estimula a entrada de íons de Ca^{2+} no citoplasma do neurônio. O influxo de Ca^{2+} induz a produção de nNOS (NO sintase neuronal) que, por sua vez, leva à liberação de óxido nítrico (NO) nos neurônios pós-sinápticos, funcionando como mensageiro para a pré-sinapse e reiniciando todo o processo.⁶⁰ Devido ao seu mecanismo de ação diferenciado, evitando a liberação excessiva de glutamato, que em altas concentrações torna-se excitotóxico e leva à morte neuronal, a memantina vem sendo indicada para os casos de evolução moderada a severa da DA.⁶¹⁻⁶³

[0019] O donepezil (6), também conhecido como E2020, surgiu no final da década de 80 como um inibidor reversível e não-competitivo da AChE,^{55,64-66} sendo o segundo fármaco aprovado pelo FDA (1996) e que rapidamente ganhou destaque por ser muito menos tóxico que a tacrina, sendo também

1250 vezes mais seletivo para AChE do que para BuChE.⁶⁴⁻⁶⁶ Vários estudos computacionais e de mecanismo de ação apontam que a seletividade deste fármaco é decorrente das subunidades N- benzilpiperidina e indanona, que conferem maior afinidade e especificidade para AChE.⁶⁶ Quanto aos aspectos farmacodinâmicos, o donepezil atua na inibição da AChE, aumentando a disponibilidade de ACh intra-sináptica⁶⁴, com poucos efeitos colaterais, a maioria de natureza colinérgica e de caráter transitório como náuseas, vômitos e tremores.^{68,69} Quanto aos aspectos farmacocinéticos o donepezil apresenta uma absorção linear, atingindo a concentração plasmática máxima em 3-5 horas após a administração, sem influência da alimentação.^{64,69} Além disso, o donepezil demonstra boa transposição da barreira hematoencefálica, atingindo concentração cerebral cerca de 7 vezes maior que no plasma, sendo, portanto, considerado um inibidor de ação central.⁶⁶ O donepezil é largamente metabolizado no fígado e a sua via principal de excreção, juntamente com seus metabólitos, é a renal, o que exige cautela na administração em pacientes com insuficiência renal e hepática.^{55,64-67} Estudos controlados duplo-cego, com mais de 1000 pacientes, revelaram que o uso de donepezil resultou em significativa melhora na memória, concentração, linguagem e raciocínio, sem sinais de toxicidade hepática.⁶⁰ Em virtude do perfil farmacocinético e de sua menor toxicidade em relação aos demais inibidores de AChE, o donepezil vem sendo utilizado como fármaco de primeira escolha no tratamento de pacientes com DA.^{69,70}

[0020] As enzimas butirilcolinesterase (BuChE) e acetilcolinesterase (AChE) como alvos contra a DA

[0021] A BuChE, também conhecida como colinesterase sérica ou acilcolina- acilidrolase, está presente principalmente nas células gliais, no tecido endotelial e nos neurônios. Juntamente com a AChE, a BuChE é responsável pela modulação dos níveis de acetilcolina e, portanto, também é um alvo terapêutico compatível com a hipótese colinérgica, a principal estratégia terapêutica para o tratamento da DA.^{71,72} Dentre os fármacos

comerciais, apenas a tacrina (1) e a rivastigmina (3) inibem concomitantemente a AChE e a BuChE. As cinéticas de hidrólise da ACh por estas duas enzimas são distintas, variando de acordo com a concentração disponível do substrato. Assim sendo, em condições onde a concentração de ACh é baixa, a BuChE é menos eficiente. Por outro lado, altas concentrações de ACh levam à inibição da AChE, tornando a BuChE mais eficiente no processo de hidrólise. Este comportamento diferenciado vem sendo explorado racionalmente no planejamento e desenvolvimento de novos inibidores seletivos, uma vez que a inibição da BuChE é considerada uma via terapêutica útil e eficaz na manutenção dos níveis colinérgicos em pacientes em que atividade da AChE esteja suprimida.⁷²

[0022] A alta reatividade e sua eficiência catalítica da AChE frente a inúmeros inibidores covalentes e não-covalentes parece originar-se da arquitetura singular do sítio ativo, constituído por uma tríade de aminoácidos, Glu-327, Ser-200 e His-440 para a AChE de *Torpedo californica* (TcAChE).⁷³⁻⁷⁶ A existência de dois gargalos de profundidades distintas, que se estendem por meio caminho da enzima e contêm o sítio catalítico a 4 Å de sua base foram reveladas pela análise das estruturas de AChE por raio-x. Além do sítio catalítico, vários resíduos de aminoácidos auxiliares, como o Trp-84, que interage com um grupo quaternário da ACh e o Trp-279,⁷⁶ localizado na abertura do gargalo que dá acesso ao sítio catalítico, estão sendo considerados como sítios de interação adicional no planejamento de novos inibidores de AChE.^{76,77} A inibição direta do sítio ativo impede a ligação da molécula substrato ou sua hidrólise por ocupação do sítio com uma afinidade alta (a exemplo da tacrina) ou por uma reação irreversível com a serina catalítica, mecanismo pelo qual agem os inseticidas organofosforados e carbamatos.⁷⁰

[0023] Além da tríade catalítica, vários sub-sítios funcionais periféricos foram identificados. Um sítio aniônico periférico está localizado próximo da superfície da enzima, acima do acesso ao sítio catalítico, no qual o resíduo de

Trp-286 exerce função particular como sítio de ligação com a subunidade amônio quaternária da ACh; uma cavidade acílica de ligação, que na AChE humana (huAChE) é constituída por resíduos Gly-122, Trp-236, Phe-295, Phe-297 e Phe-338, é responsável pelo reconhecimento e interação com a subunidade acetila da ACh.^{75,78-80} Um sub-sítio hidrofóbico, que inclui resíduos Trp-84, Tyr-130, Tyr-330 e Phe-331, que interage por empilhamento de elétrons π (interações do tipo π - π *stacking*) e/ou apolares, é responsável pela acomodação da subunidade alcoólica de um intermediário tetraédrico formado antes da liberação de colina no processo de hidrólise.⁷⁶ A estabilização de subunidades carregadas dos substratos ou outros ligantes do sítio ativo da enzima é mediado por interações do tipo cátion- π .^{78,81} Ao final do processo de hidrólise da ACh mediado pela AChE, ocorre acetilação do grupo OH de um resíduo de serina (Ser-200) que, posteriormente, sofre hidrólise, recompondo a estrutura enzimática original.^{75,82,83}

[0024] Influências do processo neuroinflamatório na instalação e progresso da DA

[0025] A inflamação é o resultado de um conjunto de reações complexas em tecidos vascularizados, em resposta à ação de agentes nocivos responsáveis por injúria ou dano tecidual, manifestando-se por migração celular, ativação de leucócitos e reações sistêmicas diversas.⁵⁵ Este tipo de resposta, recrutamento e migração de células de defesa, pode ocorrer no SNC, caracterizando a neuroinflamação.⁸⁴

[0026] Em nível crônico, a inflamação cerebral é uma característica da DA visto que as características inflamatórias agudas, tais como rubor, inchaço, calor e dor não estão presentes e estruturas como micróglia, astrócitos e neurônios são os responsáveis pela reação inflamatória. Mediadores inflamatórios como citocinas, interleucina-1 p (IL-1P), IL-6 e TNF- α , bem como leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio e outros radicais como óxido nítrico, fatores complementares, proteases, inibidores de protease e pentraxinas são

produzidos pelas células ativadas pela lesão tecidual. Uma vez que a produção de β A representa um estímulo crônico, o sistema imunológico é ativado no sentido de limpar estes produtos potencialmente tóxicos. A hipótese é que a natureza intratável das placas e emaranhados estimula uma reação inflamatória crônica.⁸⁵ A morte de neurônios adjacentes pode ocorrer por ação das células da glia ativadas cronicamente. A morte neuronal ocorre pela liberação de produtos altamente tóxicos, tais como intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico, enzimas proteolíticas e fatores complementares produzidos por estas células.⁸⁶

[0027] Recentemente, inúmeros estudos têm sido publicados abordando os benefícios adicionais que poderiam ser alcançados pelo uso de fármacos anti-inflamatórios esteroidais (AIES) e não-esteroidais (AINES) para o tratamento da neuroinflamação ocasionada pelo estresse oxidativo associado ao depósito de fragmentos tóxicos, à produção de substâncias reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e pela formação de radicais livres associados à instalação e progressão da DA.^{83,86-88}

[0028] Estudos epidemiológicos indicam que o uso continuado de AINES foi capaz de reduzir o risco de desenvolvimento da DA.⁸⁹ Um possível modo de ação desta classe de fármacos seria a inibição seletiva da COX-2, isoforma induzida expressa de modo elevado no cérebro de pacientes portadores da DA,⁹⁰ o que é reforçado por alguns estudos que demonstram que o RNA mensageiro (RNAm) da COX-2 está presente em níveis elevados em áreas cerebrais afetadas pela DA.⁹¹ Em várias partes do mundo, estudos clínicos têm sido conduzidos para avaliar o efeito de alguns AINES como tratamento auxiliar da DA, mas os resultados continuam controversos.

[0029] A hipótese de que a inflamação no tecido cerebral possa contribuir para o desenvolvimento da DA está fundamentada em estudos envolvendo pacientes com artrite reumatóide tratados com AINES.⁹²⁻⁹⁴ A inibição das enzimas COX-1 e COX-2, pelos AINES pode diminuir significativamente a síntese de prostaglandinas, resultando em supressão do

processo inflamatório. Porém, o uso prolongado destes fármacos tradicionais pode levar a distúrbios gastrintestinais.

[0030] Fármacos multi-funcionais no tratamento da DA

[0031] A busca de novos candidatos a fármacos para doenças neurodegenerativas tem sido intensa, como é o caso da doença de Alzheimer. Porém, o foco passou a ser os fármacos com ação múltipla, e não mais em um único alvo, uma vez que aliado a esta patologia atua um conjunto de fatores que unidos, como por exemplo, na DA, ocasionam o processo inflamatório, a redução de neurotransmissores, principalmente da acetilcolina, além da exacerbação da produção de radicais livres, estresse oxidativo, deposição de placas senis e neurofibrilas.⁹⁵

[0032] Com isso, pesquisas recentes estão sendo centradas em candidatos a fármacos de ação múltipla ⁹⁶ capazes de atuar simultaneamente em mais de um alvo envolvido na fisiopatologia da DA.

[0033] Quando um único medicamento não é suficiente para o tratamento de uma doença, uma das alternativas terapêuticas é a associação de "medicamentos de tratamento múltiplo", também conhecido como coquetéis. Esta abordagem consiste na combinação de dois ou mais fármacos que atuam por diferentes mecanismos terapêuticos. Outra alternativa é o uso de uma "medicação com vários compostos", onde diferentes fármacos estão contidos na formulação de um único medicamento.⁹⁶

[0034] Partindo desse mesmo pressuposto, novas abordagens estão sendo pesquisadas para um tratamento mais eficaz no caso de doenças neurodegenerativas, como é o caso dos "ligantes direcionados a múltiplos alvos" (LDMA)⁹⁶, o que evita o risco de interações entre medicamentos diferentes e facilita o regime terapêutico dos pacientes.

[0035] A estratégia de síntese dos LDMA está baseada na hibridização de subunidades farmacofóricas de duas ou mais moléculas, e ambas deverão manter a sua capacidade de interagir com seus respectivos alvos

simultaneamente, e, desta forma, procurar impedir o avanço da doença pelo bloqueio de múltiplos processos fisiopatológicos.⁹⁶

[0036] Exemplos recentes da literatura demonstram resultados promissores com novas entidades químicas capazes de atuarem como inibidores de AChE, antioxidantes, quelantes de metais, anti-amilóides, neuroprotetores e inibidores de β - secretase.^{97,98}

[0037] Para o presente pedido de patente, são utilizadas as seguintes referências bibliográficas:

1. Anand, P.; Singh, B.; Singh, N. **Bioorg. Med. Chem.** 2012, v. 20, 1175–1180.
2. Moller, H.J.; Graeber, M.B. **Eur. Arch. Psych Clin. Neurosci.** 1998, v. 248, 111–22.
3. Goedert, M.; Spillatini, M.G. **Science**.2006, v. 314, 777-81.
4. Mohamed, T. et.al. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 22 ,2012, 4707–4712.
5. Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 2003, v. 306, 821-827.
6. Samadi, A. et al. **J. Bioorg. Med. Chem.** 2011, 19, 122–133.
7. Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br/perguntas-e-respostas/quantas-pessoas-sofrem-de-doenca-de-alzheimer-no-mundo-e-no-brasil>> acesso em 28/03/2012.
8. Disponível em <<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2012/04/em-50-anos-percentual-de-idosos-mais-que-dobra-no-brasil.html>>acesso em 05/11/2012.
9. Disponível em <<http://ultimosegundo.ig.com.br/mundo/bbc/2012-10-01/mundo-tera-mais-de-1-bilhao-de-idosos-em-dez-anos-diz-onu.html>> acessado em 05/11/2012
10. Disponível em <<http://www.alzheimermed.com.br/perguntas-e-respostas/qual-e-a-idade-da-maioria-das-pessoas-com-doenca-de-alzheimer>> acessado em 05/11/2012.
11. Rang, H. P. et al. **Farmacologia**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003, p. 564-566.

12. Felice, F. G.; Ferreira, S. T. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2002**, 22, 545-563.
13. Glenner, G. G.; Wng, C. W. *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 1985, v. 120, 885-890.
14. Masters, C. L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985, v. 82, 4245-4529.
15. Kang, J. et al. *Nature*.1987, v. 325, 733-736.
16. Selkoe, D. J. *Neuron*.1991, v. 6, 487-498.
17. Selkoe, D. J. *J. Biol. Chem.*1996, v. 271, 18295-18298.
18. Geula, C. et al. *Nat. Med.*1998, v. 4, 827-831.
19. Lorenzo, A. yankner, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*1994,v. 91, 12243-12247.
20. Pike, C. J. et al. *Neurosc.* 1993, v. 13, 1676-1687.
21. Selkoe, C. J. *Curr. Opin. Neurobiol.*1994, v. 4, 708-716.
22. Verbeek, M. M.; Ruiter, D. J.; Wall, R. M. *Biol. Chem.*1997, v 402, 533-537.
23. Numan, J.; Small, D. H. *FeBes Lett.* 2000, 483, 6-10.
24. Iwatsubo, T. et al. *Neuron*.1994, v. 3, 45-53.
25. Viegas, F. P. D. et al. *Rev. Virtual Quim.*2011, v. 3 (4), 286-306
26. Disponível em
<<http://www.alzheimermed.com.br/conceitos/neuropatologia>>
acesso em 05/11/2012
27. Viegas Jr., C. et al. *Química Nova.* 2004, v. 27, 4, 655-660.
28. Colletier, J-P. et al. *The Embo Journal.* 2006, v. 25, 2746 – 2756.
29. Camps, P.; Muñoz-Torredo, D. *Mini Rev. Med. Chem.* 2002, 2, 11.
30. Viegas Jr., C. et al. *Mini Rev. Med. Chem.* 2005, v. 5, 915.
31. Savini, L.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, v. 11, 1779.
32. Gemma, S. et al. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3421.
33. Shao, D.; Zou, C.; Luo, C.; Tang, X.; Li, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*. 2004, v. 14, 4639.
34. Alcalá, M. M.; et al. *Neuropharmacol.* 2003, v. 44, 749.
35. Alonso, D. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, v. 13, 6588.

36. Valenti, P. et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 1997, v. 7, 2599.
37. Pang, Y. et al. **J. Biol. Chem.** 1997, v. 271, 23646.
38. Carlier, P. R. **Bioorg. Med. Chem.** 1999, v. 7, 351.
39. Badia, A. **Bioorg. Med. Chem.** 1998, v. 6, 427.
40. Carlier, P. R. et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 1999, v. 9, 2335.
41. Marco-Contelles, J. et al. **J. Med. Chem.** 2006, v. 49, 7607.
42. Camps, P. et al. **J. Med. Chem.** 2001, v. 44, 4733.
43. Rios, C. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2002, v. 10, 2077.
44. McKenna, M. T. et al. **J. Med. Chem.** 1997, v. 40, 3516.
45. Tumiatto, V. et al. **Curr. Med. Chem.** 2010, v. 17, 1825.
46. Rosini, M. et al. **J. Med. Chem.** 2005, v. 48, 360.
47. Pereira, J. D. et al. **Eur. J. Pharmacol.** 2011, v. 660, 411.
48. Samadi, A. et al. **J. Bioorg. Med. Chem.** 2011, v. 19, 122.
49. Marco-Contelles, J. **Bioorg. Med. Chem.** 2011, v. 19, 122.
50. Marco-Contelles, J. et al. **J. Med. Chem.** 2009, v. 52, 2724.
51. Marco-Contelles, J. et al. **J. Med. Chem.** 2006, v. 49, 7607.
52. Marco-Contelles, J. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2006, v. 14, 8176.
53. Camps, P. et al. **J. Med. Chem.** 2009, v. 52, 5365.
54. Camps, P. et al. **J. Med. Chem.** 2005, v. 48, 1701.
55. Dooley, M.; Lamb, H. M. **Drugs Aging.** 2000, v. 16, 199.
56. Fuentes, P. G.; Slachevsky, A. **Rev. Med. Chile.** 2005, 133, 224.
57. Emre, M. et al. **CNS Neurosci. Ther.** 2010, v. 16, 246.
58. Weinstock, M. **CNS Drugs.** 1999, v. 12, 307.
59. Neugrosch, J.; Sano, M. Mount Sinai **J. Med.** 2010, 77, 3; Camps, P.; Muñoz-Torredo, D. **Mini Rev. Med. Chem.** 2002, 2, 11.
60. Goodman, L. S.; Gilman, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11. ed., MacGraw-Hill Interamericana do Brasil: Rio de Janeiro, 2006.
61. Viegas Jr., C. et al. **Quím. Nova.** 2004, v. 27, 655.
62. Colletier, J-P. et al. **The Embo Journal.** 2006, v. 25, 2746.

63. Rocha, M. D. et al. **CNS Neurol. Dis. Drug Targ.** 2011, v. 10, 251.
64. Goldsmith, D. R.; Scott, L. J. **Drugs Aging.** 2003, v. 20, 1127.
65. Jackson, S.; Ham, R. J.; Wilkinson, D. **Brit. J. Clin. Pharmacol.** 2004, 58, 1.
66. Sugimoto, H. et al. **J. Pharmacol.** 2002, v. 89, 7.
67. Wilkinson, D. G. et al. **Drugs Aging.** 2004, v. 21, 453.
68. Jann, M. W.; Shirley, K. R.; Small, G. W. **Clin. Pharmacokinet.** 2002, v. 41, 719.
69. Rogers, S. L.; Friedhoff, L. T. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 1998, 46, 1.
70. Viegas Jr. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2005, v. 13, 4184.
71. Freitas, H. F.; Paz, O. S.; Castilho, M. S. **Quim. Nova.** 2009, v. 32, 2114.
72. Greig, N. H. et al. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 2005, v. 102, 17213.
73. Scheuner, D. et al. **Nat. Med.** 1996, v. 2, 864.
74. Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Ariel, N.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A. **J. Biol. Chem.** 1998, 273, 19509.
75. Guo, J.; Hurley, M. M.; Wright, J. B.; Lushington, G. H. **J. Med. Chem.** 2004, 47, 5492.
76. Scheuner, D. et al. **Nat. Med.** 1996, v. 2, 864.
77. Tripathi, A.; Srivastava, U. C. **Annals of Neurosci.** 2008, 15, 106.
78. Ordentlich, A. et al. **J. Biol. Chem.** 1998, v. 273, 19509.
79. Hörnberg, A. et al. **Biochemistry.** 2005, v. 44, 1154.
81. Castro, A.; Martinez, A. **Mini Rev. Med. Chem.** 2001, v. 1, 267
82. Scheuner, D. et al. **Nat. Med.** 1996, 2, 864.
83. Geula, C. **Nat. Med.** 1998, v. 4, 827.
84. Minetti, T. S. C.; Bertolucci, P. H. F. **Rev. Neuroc.** 2000, v. 8, 11.
85. Emre, M. et al. **J. Med.** 2004, 351, 2509.
86. Vasto, S.; et al. **Brain Res. Rev.** 2008, v. 58, 96-105.
87. Giunta, B. et al. **J. Inflammation.** 2008, v. 5, 51.

88. Rocha-González, H.I.; Ambriz-Tututi, M.; Granados-Soto, V. **CNS Neurosci. Ther.** 2008, v. 14, 234.
89. Heneka, M. T.; O'Banion, M. K. **J. Neuroimmunol.** 2007, 184, 69.
90. Hoozemans, J. J. et al. **Curr. Drug Targ.** 2003, 4, 461.
91. Tuppo, E. E.; Arias, H. R. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 2005, v. 37, 289.
92. Hol, P. C.; et al. **Neurosci. Res.** 1999, v. 57, 295.
93. Campos, H. C. et al. **CNS Neurol. Dis. Drug Targ.**, 2011, v. 10, 239.
94. Aisen, P. S. **Lancet Neurol.** 2002, v. 1, 279.
95. Vasto, S., et al. **Brain Res. Rev.** 2008, v. 58, 96.
96. Cavalline, A. et al. **J. Med. Chem.** 2008, v. 51, 347.
97. Bolognese, L. M.; Matera, R.; Minarini, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C. **Cur. Opin. Chem. Bio.** 2009, v. 12, 303-308.
98. Bolognese, L. M. et al. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 2011, v. 21, 2655–2658.
99. Lima, L. M. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2002, v. 10, 3067-3073.
100. Silverstain, R. M.; Webster, F. X.; Klemie, D.J. **Identificação de compostos orgânicos**, 7 ed., LTC, 2006
101. Kim, S.; Oh, C. H.; Ko, J. S.; Ahn, K. H.; Kim, Y. J. **J. Org. Chem.** 1985, v. 50, 1927-1932.
102. Romeiro, N. C. et al. **Bioorg. Med. Chem.** 2009, v. 17, 641-652.
103. Barreiro, E. J. et al. **Eur. J. Med. Chem.** 2000, v. 35, 187-203.
104. Hansen, M. M. e Riggs, J. A. **Tet. Lett.** 1998, v. 39, 2705-2706.
105. Ellman, G. L.; Courtney, D. K.; Andres. V. Jr.; Feartherstone, R. M. **Biochem. Pharmacol.** 1961, v.7, 88-95.
106. Castro, N. C. et al. **Eur. J. Pharmacol.** 2008, v. 580, 339–349.
107. Vilela, F. C. et al. **J. Ethnopharmacol.** 2009, v. 124, 306-310,
108. Veloso, Clarice C. et al. **Rev. Bras. Farmacog.** 2012, v. 22, 162-168.
109. Viegas Jr, C. **Chem Pharmaceutical Bulletin**, 2008, v. 56, 407-412.
110. Perrin, D. D.; Armarengo W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. 3 ed., Pergamon Press, 1988.

111. Maia, R. C.; et al.; **Bioorg. Med. Chem.** 2009, v. 17, 6517.

112. Orlandi, L. et al. **J. Ethnopharmacol**, 2011, v. 137, 1469-1476.

113. Santos, A. R. S.; Calixto, J. B. **Neuropept.** 1997, v. 31(4), 381-389.

[0038] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0039] O documento US 2004/0087658 A1 revela combinações de fármacos para o tratamento de demências como, por exemplo, a combinação entre um derivado 1-aminociclohexano e um inibidor da acetilcolinesterase. Entretanto, as moléculas reveladas no referido documento US 2004/0087658 A1 são distintas daquelas reveladas pela presente invenção.

[0040] O documento WO 99/25363 A1 revela a combinação de tetraidropiridinas e inibidores da acetilcolinesterase para o tratamento de demência senil, incluindo Alzheimer. No entanto, tais compostos ou suas combinações reveladas pelo documento WO 99/25363 A1 diferem daquelas reveladas na presente invenção.

[0041] O documento WO 2010/019560 A1 revela derivados deuterados do donepezil, seus metabólitos e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Entretanto, não se revelam no referido pedido de patente WO 2010/019560 A1 as combinações dos compostos da presente invenção. Também não se revela o perfil duplo (anti-inflamatório e anticolinesterásico) dos compostos da presente invenção.

[0042] O documento WO 2014/008629 A1 revela compostos derivados do fármaco donepezil. Entretanto, não estão revelados no referido pedido de patente WO 2010/019560 A1 os compostos da presente invenção ou suas combinações e a característica de perfil duplo (anti-inflamatório e anticolinesterásico).

[0043] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da

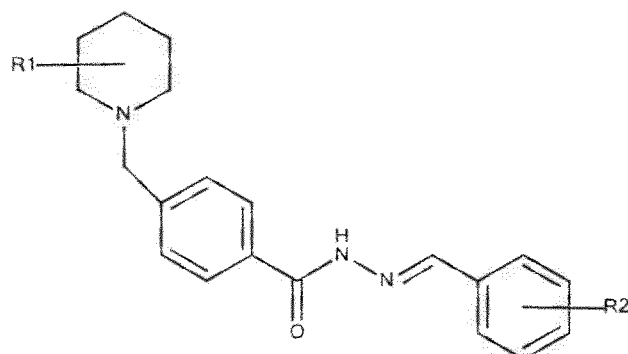
presente invenção, de forma que aos olhos dos inventores a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0044] Resta na técnica a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos e novas combinações de fármacos com atividade biológica para o tratamento de doenças neurodegenerativas como, por exemplo, as demências, incluindo-se Alzheimer. Também resta na técnica a necessidade do desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para patologias neurodegenerativas. Tendo em vista que as doenças neurodegenerativas muitas vezes são reflexos de um conjunto de fatores, tem-se a necessidade de centrar as pesquisas em candidatos a fármacos de ação múltipla capazes de atuar simultaneamente em mais de um alvo envolvido na fisiopatologia da Doença de Alzheimer (DA).

Sumário da Invenção

[0045] A presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de um novo composto, planejado por hibridação molecular com o protótipo LASSBio-767 e com derivados alcaloídicos arilidrazônicos, contemplando a subunidade N-benzil piperidínica do fármaco donepezil e uma unidade espaçadora N-acilidrazona. Através de uma análise retrossintética, foi possível estabelecer uma rota de síntese para o referido composto. O referido composto, em diversas concretizações, demonstrou possuir importantes propriedades farmacológicas, podendo atuar como anti-colinesterásico, anti-inflamatório, anti-amilóide, neuroprotetor, além de apresentar adicionalmente perfil múltiplo de ação, contemplando tanto a propriedade de inibir a enzima acetilcolinesterase quanto a propriedade anti-inflamatória. As propriedades farmacológicas e o perfil de ação múltiplo do referido composto são particularmente úteis no tratamento curativo ou profilático de doenças neurodegenerativas.

[0046] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um composto representado pela fórmula I:



em que

R1 é escolhido do grupo que consiste de: OH, CH₃CHOO, oxialquila, oxiarila e carbamoila; e

R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolinil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc, triazolila, aminoalquila, aminoarila, O-alquila, arila, carbamoila, NHCO-alquila, e NHCO-arila.

[0047] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um processo de síntese do composto representado pela fórmula I, que compreende as seguintes etapas:

a) reação de esterificação do ácido 4-formil-benzóico (ou 4-carboxibenzaldeído) em solvente clorado ou em solvente não clorado, na presença de composto transferidor de grupo halogênio e de dimetilformamida (DMF);

b) adição de álcool primário, secundário ou terciário;

c) reação de aminação redutiva entre o produto obtido em b) e 3-hidroxipiperidina, na presença de NaBH₃CN, ácido de Lewis, MeOH e N₂;

d) reação do produto obtido em c) com monoidrato de hidrazina; e

e) reação do produto obtido em d) com benzaldeído R2-substituído.

[0048] Em outro objeto, a presente invenção apresenta o uso do composto conforme definido acima para a fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de doença neurodegenerativa.

[0049] Em outro objeto, a presente invenção apresenta o uso do composto conforme definido acima para a fabricação de uma composição anti-inflamatória e anti-colinesterásica.

[0050] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um método de tratamento de doença neurodegenerativa que compreende administração do composto conforme definido acima a um indivíduo propenso a ou portador de doença neurodegenerativa, em um regime de dose que varia entre $1\mu\text{mol/kg}$ do indivíduo e $300\mu\text{mol/kg}$ do indivíduo.

[0051] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um método de tratamento de inflamações que compreende administração do composto conforme definido acima a um indivíduo propenso a ou portador de inflamação, em um regime de dose que varia entre $1\mu\text{mol/kg}$ do indivíduo e $300\mu\text{mol/kg}$ do indivíduo.

[0052] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um método de inibição da enzima acetilcolinesterase que compreende contatar o composto conforme definido acima com a enzima acetilcolinesterase.

[0053] O conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados reside no padrão estrutural inédito do composto, que resulta em importantes propriedades farmacológicas e novos mecanismos de ação, úteis no tratamento curativo ou profilático de inflamação e/ou de doenças neurodegenerativas.

[0054] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0055] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as presentes figuras:

- [0056] A figura 1 mostra o planejamento molecular de uma nova série de candidatos a protótipos de fármacos de ação dupla para o tratamento da DA.
- [0057] A figura 2 mostra a rota sintética utilizada para a preparação dos compostos-alvo de algumas concretizações da invenção.
- [0058] A figura 3 mostra o Espectro 1. Espectro no IV (KBr) do 4-formilbenzoato de metila (13).
- [0059] A figura 4 mostra o Espectro 2. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) do 4-formilbenzoato de metila (13).
- [0060] A figura 5 mostra o Espectro 3. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, MeOD) do 4-formilbenzoato de metila (13).
- [0061] A figura 6 mostra o Espectro 4. Espectro de massas de alta resolução do 4-formilbenzoato de metila (13).
- [0062] A figura 7 mostra o Espectro 5. Espectro no IV (KBr) do 4-((3-hidroxipiperid-1-ila)metil) benzoato de metila (11).
- [0063] A figura 8 mostra o Espectro 6. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) do 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoato de metila (11).
- [0064] A figura 9 mostra o Espectro 7. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) do 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoato de metila (11).
- [0065] A figura 10 mostra o Espectro 8. Espectro de massas de alta resolução do 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoato de metila.
- [0066] A figura 11 mostra o Espectro 9. Espectro no IV (KBr) da 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoilidrazida (10).
- [0067] A figura 12 mostra o Espectro 10. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) da 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoilidrazida (10).
- [0068] A figura 13 mostra o Espectro 11. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) da 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoilidrazida (10).
- [0069] A figura 14 mostra o Espectro 12. Espectro de massas de alta resolução de 4-((3-hidroxipiperididin-1-il)metil)benzoilidrazida (10).
- [0070] A figura 15 mostra o Espectro 13. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-54.

- [0071] A figura 16 mostra o Espectro 14. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) da substância LFQM-54.
- [0072] A figura 17 mostra o Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) da substância LFQM-54.
- [0073] A figura 18 mostra o Espectro 16. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-54.
- [0074] A figura 19 mostra o Espectro 17. Espectro no IV (KBr) da substâncias LFQM-55.
- [0075] A figura 20 mostra o Espectro 18. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-55.
- [0076] A figura 21 mostra o Espectro 19. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-56.
- [0077] A figura 22 mostra o Espectro 20. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) da substância LFQM-56.
- [0078] A figura 23 mostra o Espectro 21. Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO- d_6) da substância LFQM-56.
- [0079] A figura 24 mostra o Espectro 22. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-56.
- [0080] A figura 25 mostra o Espectro 23. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-57.
- [0081] A figura 26 mostra o Espectro 24. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-57.
- [0082] A figura 27 mostra o Espectro 25. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-65.
- [0083] A figura 28 mostra o Espectro 26. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LFQM-65.
- [0084] A figura 29 mostra o Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C dept Q (100 MHz, MeOD) da substância LFQM-65.
- [0085] A figura 30 mostra o Espectro 28. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-65.

[0086] A figura 31 mostra o Espectro 29. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-66

[0087] A figura 32 mostra o Espectro 30. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-66.

[0088] A figura 33 mostra o Espectro 31. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-67.

[0089] A figura 34 mostra o Espectro 32. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) da substância LFQM-67.

[0090] A figura 35 mostra o Espectro 33. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) da substância LFQM-67.

[0091] A figura 36 mostra o Espectro 34. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-67.

[0092] A figura 37 mostra o Espectro 31. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-72.

[0093] A figura 38 mostra o Espectro 32. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) da substância LFQM-72.

[0094] A figura 39 mostra o Espectro 33. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) da substância LFQM-72.

[0095] A figura 40 mostra o Espectro 35. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-72.

[0096] A figura 41 mostra o Espectro 36. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-75.

[0097] A figura 42 mostra o Espectro 37. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) da substância LFQM-75.

[0098] A figura 43 mostra o Espectro 38. Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) da substância LFQM-75.

[0099] A figura 44 mostra o Espectro 39. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-75.

[0100] A figura 45 mostra o Espectro 40. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-76.

- [0101] A figura 46 mostra o Espectro 41. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-76.
- [0102] A figura 47 mostra o Espectro 42. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-88.
- [0103] A figura 48 mostra o Espectro 43. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, MeOD) da substância LFQM-88.
- [0104] A figura 49 mostra o Espectro 44. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) da substância LFQM-88.
- [0105] A figura 50 mostra o Espectro 45. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-88.
- [0106] A figura 51 mostra o Espectro 46. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-58.
- [0107] A figura 52 mostra o Espectro 47. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-58.
- [0108] A figura 53 mostra o Espectro 48. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-68.
- [0109] A figura 54 mostra o Espectro 49. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-68.
- [0110] A figura 55 mostra o Espectro 50. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-73.
- [0111] A figura 56 mostra o Espectro 51. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, MeOD) da substância LFQM-73.
- [0112] A figura 57 mostra o Espectro 52. Espectro de RMN dept Q (100 MHz, MeOD) da substância LFQM-73.
- [0113] A figura 58 mostra o Espectro 53. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-73.
- [0114] A figura 59 mostra o Espectro 54. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-84.
- [0115] A figura 60 mostra o Espectro 55. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) da substância LFQM-84.

[0116] A figura 61 mostra o Espectro 56. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) da substância LFQM-84.

[0117] A figura 62 mostra o Espectro 57. Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-84.

[0118] A figura 63 mostra o Espectro 58. Espectro no IV (KBr) da substância LFQM-87.

[0119] A figura 64 mostra o Espectro 59 -Espectro de massas de alta resolução da substância LFQM-87.

[0120] A figura 65 mostra o estudo da seletividade AChE x BUCHE das substâncias mais ativas in vitro.

[0121] A figura 66 mostra o estudo do mecanismo de ação das substâncias LFQM-56, LFQM-57, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-75, LFQM-76 e LFQM-88.

[0122] A figura 67 mostra um esquema 1 indicando o desenho experimental do teste de reconhecimento de objeto novo no quarto dia de experimento.

[0123] A figura 68 mostra o efeito de LFQM-56, LFQM-57, LFQM-67, LFQM-75 e LFQM-88 (100 $\mu\text{mol/kg}$ v.o.) no teste de reconhecimento de objeto novo em camundongos ($n = 05-19$). Diferença significativa no tempo de exploração dos diferentes objetos dentro do mesmo grupo (Teste t pareado, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$). B) Efeito de LFQM-56, LFQM-57, LFQM-67, LFQM-75 e LFQM-88 (100 $\mu\text{mol/kg}$ v.o.) sobre a amnésia induzida por escopolamina (0,3 mg/kg i.p.) no teste de reconhecimento de objeto novo em camundongos ($n = 08-19$). Diferença significativa no tempo de exploração dos diferentes objetos dentro do mesmo grupo (Teste t pareado, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$).

[0124] A figura 69 mostra o Efeito de LFQM-56, LFQM-57, LFQM-67, LFQM-75 e LFQM-88 (100 $\mu\text{mol/kg}$ v.o.) sobre o deslocamento total dos animais no interior da arena. (A) Sessão treino. ANOVA ($F_{11,126} = 7,095$; $P < 0.001$). Diferença significativa com relação ao grupo SAL+SAL no teste post-hoc de Turkey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. (B) Sessões teste. ANOVA

(F11,126 = 5,800; $P < 0,001$). Diferença significativa com relação ao grupo SAL+SAL no teste post-hoc de Turkey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

[0125] A figura 70 mostra experimento realizado com administração de donepezil nas doses de 1, 3 e 5 mg/kg em animais submetidos à administração intratecal de proteína beta-amiloide enovelada.

[0126] A figura 71 mostra o efeito anti-inflamatório das substâncias-alvo (100 μM) de algumas concretizações da invenção, no ensaio de Von Frey, utilizando a indometacina (100 μM) como padrão positivo, (a)-(h).

[0127] A figura 72 mostra o efeito anti-inflamatório das substâncias-alvo (100 μM) de algumas concretizações da invenção, no ensaio de Von Frey, utilizando a indometacina (100 μM) como padrão positivo, (i)-(p).

[0128] A figura 73 mostra o gráfico de área sobre a curva do efeito anti-inflamatório de todas as substâncias-alvo (100 μM) de algumas concretizações da invenção, no ensaio de Von Frey, utilizando a indometacina (100 μM) como padrão. ### $p < 0.001$ quando comparado com o grupo controle sem carragenina. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle com carragenina.

[0129] A figura 74 mostra o efeito das substâncias-teste LFQM-56, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-73, LFQM-74, LFQM-75, LFQM-76, LFQM-84 (100 $\mu\text{mol/kg}$), indometacina (100 $\mu\text{mol/kg}$) e morfina (39 $\mu\text{mol/kg}$) sobre as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina.

[0130] A figura 75 mostra o efeito das acilidrazonas LFQM-56, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-73 e LFQM-74 (100 $\mu\text{mol/kg}$), no ensaio de edema de pata de camundongo induzido por carragenina.

[0131] A figura 76 mostra a curva dose-resposta e estimativa da ID50 das acilidrazonas LFQM-56, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-73 e LFQM-74, no ensaio de edema de pata de camundongo induzido por carragenina após a 3ª hora.

[0132] A figura 77 mostra que as substâncias LFQM-56, LFQM-57, LFQM-65 e LFQM-67 não modulam a ativação de NF-kB induzida por LPS em

macrófagos RAW 264.7. As células foram pré-incubadas com meio, veículo, LFQM-56 (A), LFQM-57 (B), LFQM-65 (C) ou LFQM-67 (D), 30 minutos antes da adição do LPS. Dados representam unidades de luminescência, que indiretamente representam a atividade do NF- κ B. Barras representam a média de quatro experimentos independentes \pm E.P.M. (A) $F_{5,85} = 7,91$; (B) $F_{5,63} = 5,88$; (C) $F_{5,62} = 7,62$; (D) $F_{5,68} = 9,72$. # $P < 0,05$ comparado ao grupo meio.

[0133] A figura 78 mostra a avaliação da produção de malondialdeído (MDA) sexto dia (B) após a infecção com PbA em camundongos C57BL6 ($n=5$ /grupo). Como controle, um grupo de animais foi inoculado com hemácias não parasitadas (RBC) ($p>0,05$, teste de Tukey).

[0134] A figura 79 mostra a avaliação da produção de tiol livre no sexto dia após a infecção com PbA em camundongos C57BL6 ($n=5$ /grupo). Como controle, um grupo de animais foi inoculado com hemácias não parasitadas (RBC) ($p>0,05$, teste de Tukey).

[0135] A figura 80 mostra a avaliação da produção de mieloperoxidase (MPO) no sexto dia após a infecção com PbA em camundongos C57BL6 ($n=5$ /grupo). Como controle, um grupo de animais foi inoculado com hemácias não parasitadas (RBC) ($p>0,05$, teste de Tukey).

[0136] A figura 81 mostra o desenho experimental do procedimento para avaliação do efeito sobre o déficit mnemônico induzido pela administração hipocampal de proteína β -amiloide.

[0137] A figura 82 mostra os dados da avaliação das substâncias LFQM-56 e LFQM-67 no modelo de reconhecimento do objeto novo após administração da proteína β -amiloide no hipocampo. Dados estatísticos: One way ANOVA $F(5,50) = 4.3$; $p < 0.01$. * Diferença estatística do grupo PBS + Abeta dos grupos: PBS+ veículo; Abeta LFQM-56 (50uM e 100uM) e LFQM-67 100uM. # Diferença estatística do grupo PBS + veículo do grupo Abeta LFQM-67 50uM. N grupos = 10, 7, 9, 8, 11, 11, respectivamente.

[0138] A figura 83 mostra os dados da avaliação da substância LFQM-88 no modelo de reconhecimento do objeto novo após administração da proteína

β -amilóide no hipocampo. Dados estatísticos: One way ANOVA $F(3,16) = 4.08$, $P < 0.05$. Post-hoc Duncan amiloid beta diferente do controle e LFQM-88 50 e 100 μ M

[0139] A figura 84 mostra os dados da avaliação das substâncias LFQM-57 e LFQM-75 no modelo de reconhecimento do objeto novo após administração da proteína β -amilóide no hipocampo. Dados estatísticos: One way ANOVA $F(3,25) = 5.3$, $P < 0.01$. Post-hoc Duncan amiloid beta LFQM-57 e LFQM-75 diferente do controle.

[0140] A figura 85 mostra os dados da avaliação das substâncias LFQM-56 e LFQM-67 e do donepezil, administrados v.o, no modelo de reconhecimento do objeto novo após administração da proteína β -amilóide no hipocampo. Diferença estatística do grupo PBS+ vehicle. N experimental: 5, 8, 8, 8, 8, 6, 8, 8, 6, 6, 6 respectivamente.

[0141] A figura 86 mostra o efeito das substâncias LFQM-56, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-73 e LFQM-74 no ensaio de campo aberto na dose de 100 μ M.

[0142] A figura 87 mostra células HepG2 que foram tratadas com os diferentes compostos (50 μ M) por 3h. Houve redução do IDN nas condições experimentais testadas indicando que os compostos exerceram atividade citostática sobre as células da linhagem HepG2. DMSO: controle negativo. Doxorubicina (DXR): controle positivo. *Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

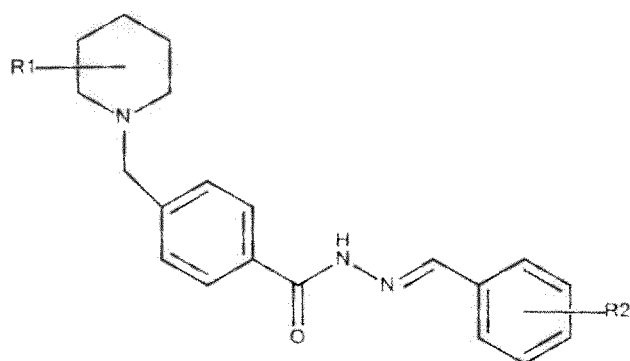
[0143] A figura 88 mostra células HepG2 que foram tratadas com os diferentes compostos (20 μ M) por 3h. Não houve diferença significativa no IDN. DMSO: controle negativo. Doxorubicina (DXR): controle positivo.

[0144] A figura 89 mostra a frequência de micronúcleos avaliada em culturas de células HepG2 tratadas com os diferentes compostos a 20 μ M por 3h de acordo com os critérios proposto por Fenech, 2000. Houve aumento significativo ($p < 0.05$) na frequência de MNs em culturas tratadas com os compostos LFQM-57, LFQM-67 e LFQM-75. DMSO: controle negativo.

Doxorrubicina (DXR): controle positivo.

Descrição Detalhada da Invenção

[0145] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um composto de acordo com a fórmula I:



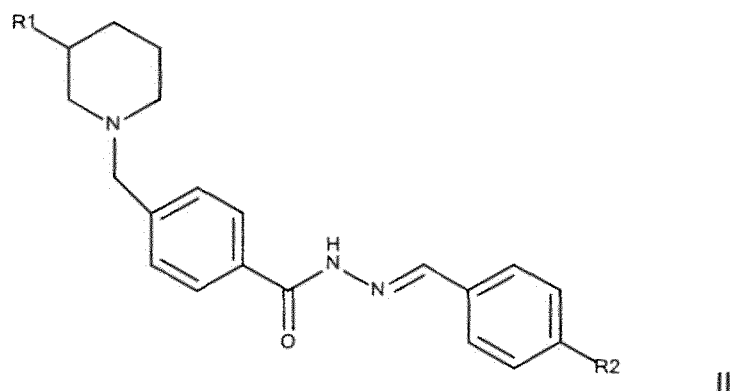
em que

R1 é escolhido do grupo que consiste de: OH, CH₃CHOO, oxialquila, oxiarila e carbamoila; e

R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolinil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc, triazolila, aminoalquila, aminoarila, O-alquila, arila, carbamoila, NHCO-alquila, e NHCO-arila.

[0146] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula I, em que R1 é escolhido do grupo que consiste de: OH ou AcO; e R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc.

[0147] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula II:



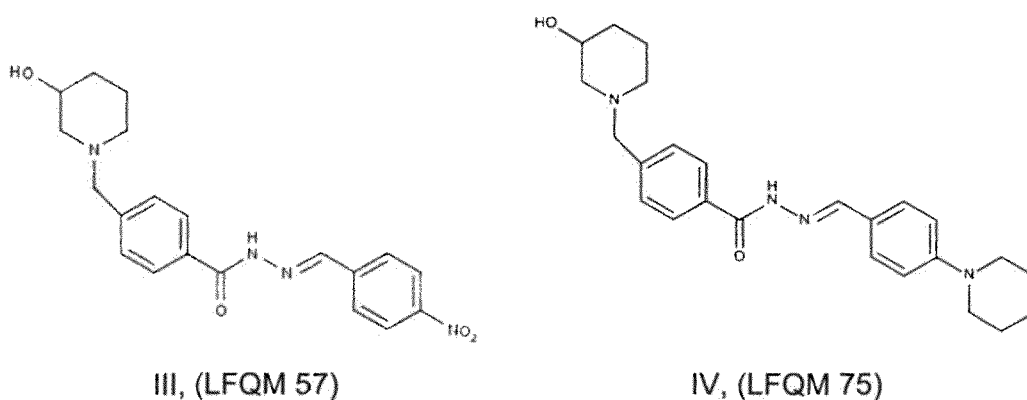
em que

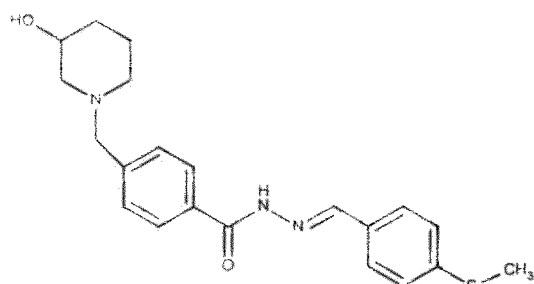
R1 é escolhido do grupo que consiste de: OH, CH₃CHOO, oxialquila, oxiarila e carbamoila; e

R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolinil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc, triazolila, aminoalquila, aminoarila, O-alquila, arila, carbamoila, NHCO-alquila, e NHCO-arila.

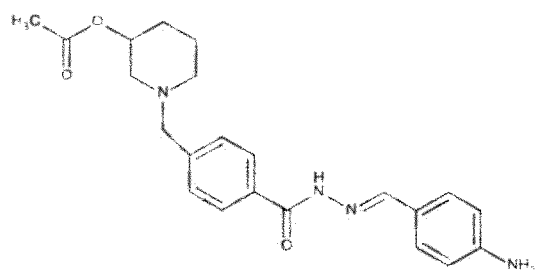
[0148] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula II, em que R1 é escolhido do grupo que consiste de: OH ou AcO; e R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc.

[0149] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula III, fórmula IV, fórmula V, fórmula VI, fórmula VII, fórmula IV, fórmula VIII ou fórmula IX:

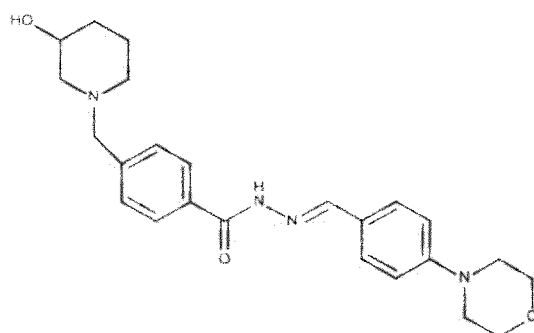




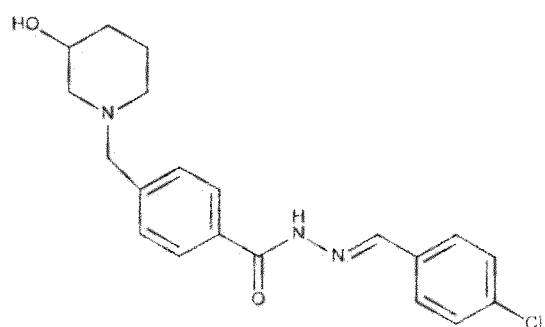
V, (LFQM 88)



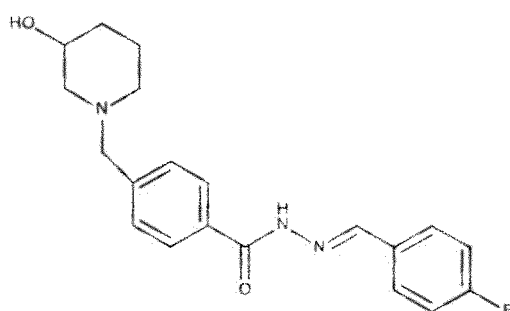
VI, (LFQM 73)



VII, (LFQM 74)



VIII, (LFQM 56)



IX, (LFQM 67)

[0150] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um processo de síntese de composto conforme definido acima, que compreende as etapas:

a) reação de esterificação do ácido 4-formil-benzóico (ou 4-carboxibenzaldeído) em solvente clorado ou em solvente não clorado, na presença de composto transferidor de grupo halogênio e de dimetilformamida (DMF);

b) adição de álcool primário, secundário ou terciário;

c) reação de aminação redutiva entre o produto obtido em b) e 3-hidroxipiperidina, na presença de NaBH_3CN , ácido de Lewis, MeOH e N_2 ;

d) reação do produto obtido em c) com monoidrato de hidrazina; e

e) reação do produto obtido em d) com benzaldeído R2-substituído.

[0151] Em uma concretização, o processo compreende adicionalmente a etapa f) reação de acetilação com anidrido acético e 4-(N,N-dimetilamino)piridina (4-DMAP).

[0152] Em uma concretização, a etapa a) ocorre em refluxo, durante um intervalo de tempo que varia entre 20 minutos e 60 minutos.

[0153] Em uma concretização, a etapa a) ocorre durante um intervalo de tempo de 40 minutos.

[0154] Em uma concretização, a etapa b) ocorre num intervalo de tempo que varia entre 5 minutos e 20 minutos.

[0155] Em uma concretização, a etapa b) ocorre durante um intervalo de tempo de 10 minutos.

[0156] Em uma concretização, a etapa d) ocorre na presença de álcool, em refluxo, num intervalo de tempo que varia entre 1 hora e 5 horas.

[0157] Em uma concretização, o álcool é etanol.

[0158] Em uma concretização, o intervalo de tempo é 3 horas.

[0159] Em uma concretização, o benzaldeído R2-substituído da etapa e) é um benzaldeído R2-substituído em que R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO_2 , OMe, 3-pirrolidinil, F, NH_2 , 4-morfolil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc.

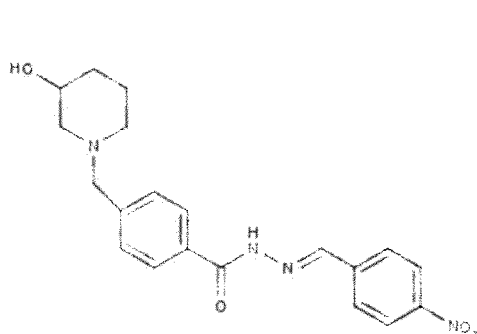
[0160] Em uma concretização, a etapa e) ocorre num intervalo de tempo que varia entre 1 hora e 24 horas.

[0161] Em outro objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e o composto conforme definido anteriormente.

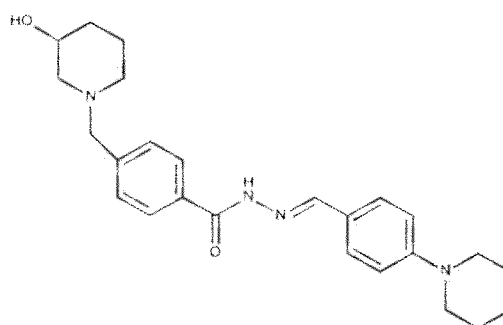
[0162] Em uma concretização, o referido composto está presente na composição em uma proporção entre 0,01% m/m e 95% m/m.

[0163] Em outro objeto, a presente invenção apresenta o uso de composto definido acima para fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de doença neurodegenerativa, que pode ser: doença de Alzheimer, doença de Huntington, amnésia, depressão nervosa, transtorno obsessivo compulsivo e/ou esclerose lateral amiotrófica.

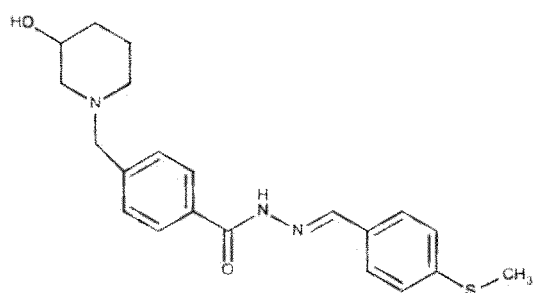
[0164] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula III, fórmula IV, fórmula V, fórmula VI, fórmula VII, fórmula VIII ou fórmula IX:



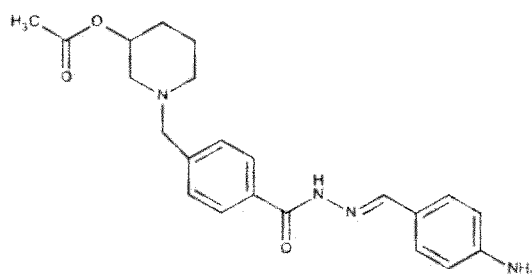
III, (LFQM 57)



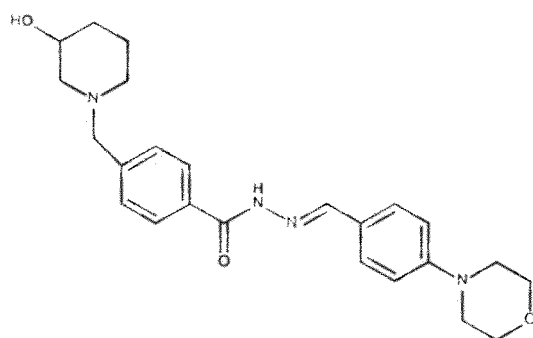
IV, (LFQM 75)



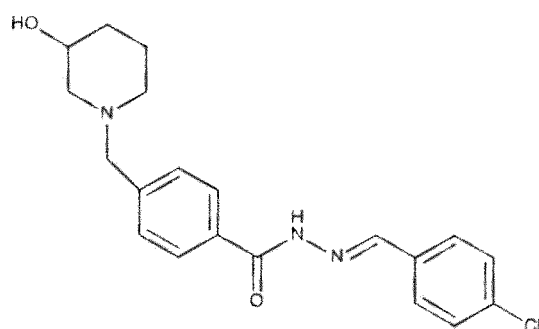
V, (LFQM 88)



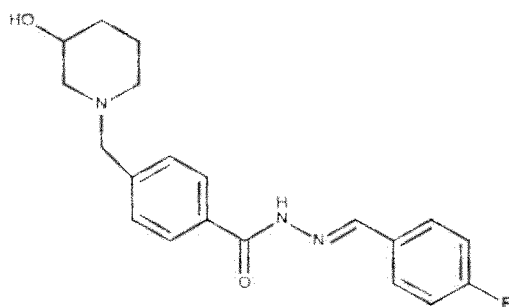
VI, (LFQM 73)



VII, (LFQM 74)



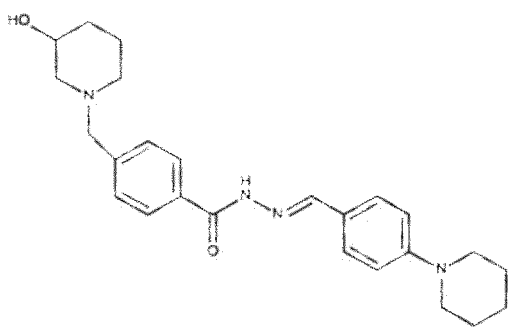
VIII, (LFQM 56)



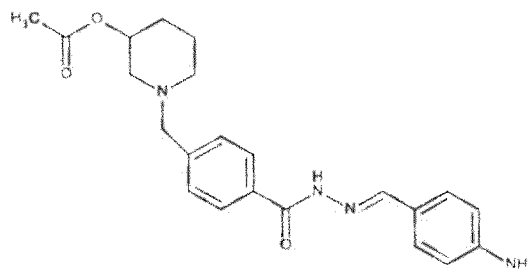
IX. (LFQM 67)

[0165] Em outro objeto, a presente invenção apresenta o uso de composto definido acima para fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de inflamações.

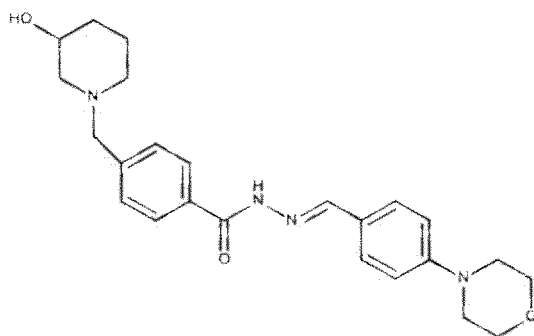
[0166] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula IV, fórmula VI, fórmula VII, fórmula VIII ou fórmula IX:



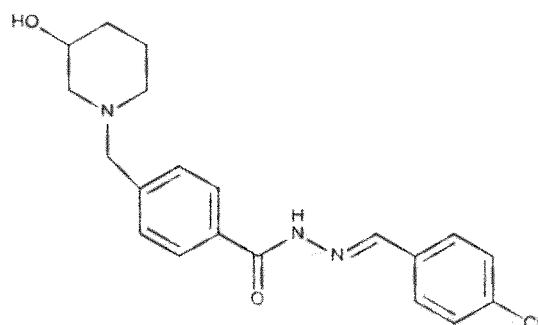
IV, (LFQM 75)



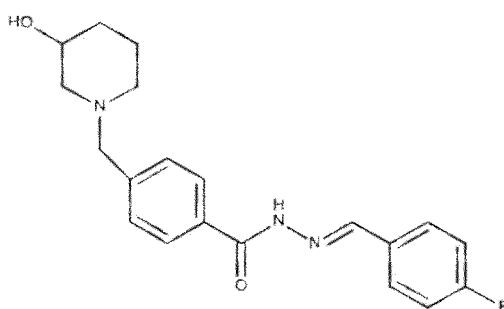
VI, (LFQM 73)



VII, (LFQM 74)



VIII, (LFQM 56)

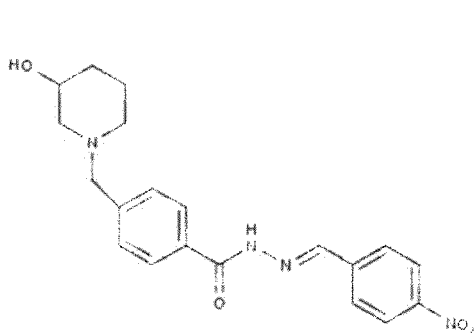


IX. (LFQM 67)

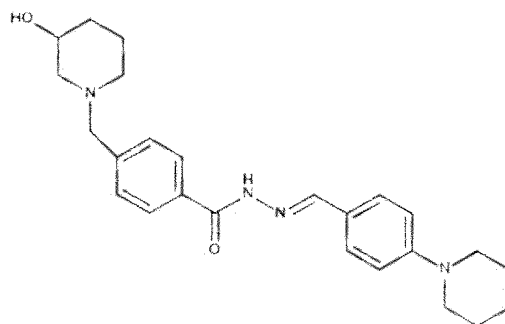
[0167] Em outro objeto, a presente invenção apresenta o uso de composto conforme definido anteriormente para fabricação de uma composição anti-inflamatória e anti-colinesterásica.

[0168] Em uma concretização, a composição anti-inflamatória e anticolinesterásica é útil para o tratamento curativo ou profilático de doença neurodegenerativa, escolhida do grupo que consiste de: doença de Alzheimer, doença de Huntington, amnésia, depressão nervosa, transtorno obsessivo compulsivo e/ou esclerose lateral amiotrófica.

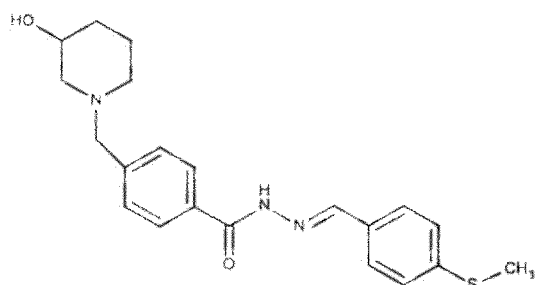
[0169] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula III, fórmula IV, fórmula V, fórmula VI, fórmula VII, fórmula VIII ou fórmula IX:



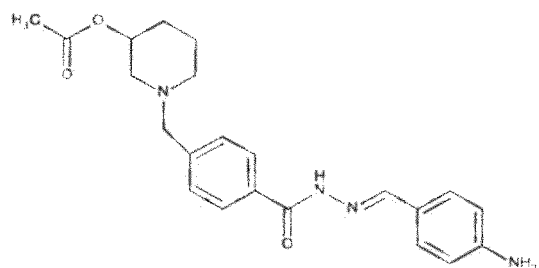
III, (LFQM 57)



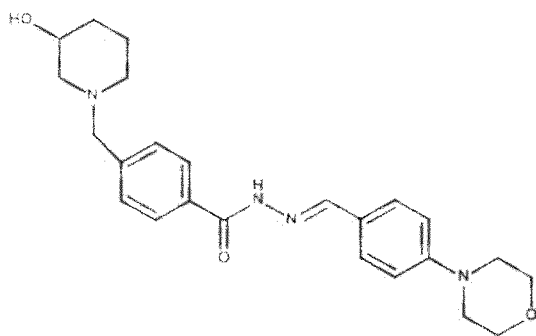
IV, (LFQM 75)



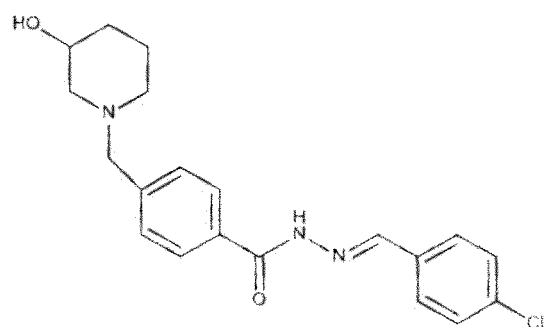
V, (LFQM 88)



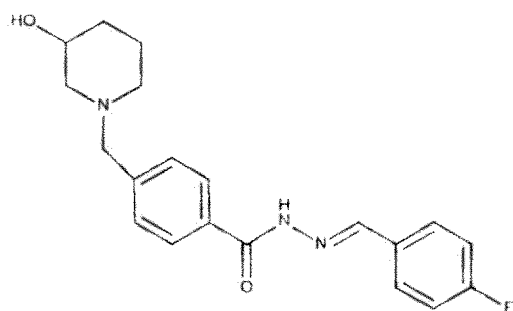
VI, (LFQM 73)



VII, (LFQM 74)



VIII, (LFQM 56)



IX, (LFQM 67)

[0170] Em outro objeto, a presente invenção apresenta uma forma de dosagem oral que compreende pelo menos um composto ou um sal farmaceuticamente aceitável do referido composto conforme definido no presente pedido de patente e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[0171] Em uma concretização, o composto ou seu sal farmaceuticamente aceitável está presente em uma quantidade que varia de 0,0001% em peso a 99% em peso.

[0172] Em uma concretização, o composto ou seu sal farmacologicamente aceitável está presente em uma quantidade que varia de 0,001% em peso a 99% em peso.

[0173] Em uma concretização, o composto ou seu sal farmacologicamente aceitável está presente em uma quantidade que varia de 0,01% em peso a 50% em peso.

[0174] Em uma concretização, o composto ou seu sal farmacologicamente aceitável está presente em uma quantidade que varia de 0, 1% em peso a 20% em peso.

[0175] Em uma concretização, o composto está em uma dosagem que varia entre 1 ng e 5 g.

[0176] Em uma concretização, o composto está em uma dosagem que varia entre 1 µg e 1g.

[0177] Em uma concretização, a forma de dosagem oral é sólida ou líquida.

[0178] Em uma concretização, a forma de dosagem oral é sólida.

[0179] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um método de tratamento de doença neurodegenerativa que compreende administração de composto definido anteriormente a um indivíduo propenso a ou portador de doença neurodegenerativa, em um regime de dose que varia entre 1 pmol/kg de massa corpórea do indivíduo e 1 mol/kg de massa corpórea do indivíduo.

[0180] Em uma concretização, o regime de dose varia entre 1 pmol/kg de massa corpórea do indivíduo e 1 mmol/kg de massa corpórea do indivíduo.

[0181] Em uma concretização, o regime de dose varia entre 1 nmol/kg de massa corpórea do indivíduo e 900 µmol/kg de massa corpórea do indivíduo.

[0182] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 nmol/kg do indivíduo e 900 nmol/kg do indivíduo.

[0183] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 nmol/kg do indivíduo e 600 nmol/kg do indivíduo.

[0184] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 nmol/kg do indivíduo e 300 nmol/kg do indivíduo.

[0185] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 nmol/kg do indivíduo e 100 nmol/kg do indivíduo.

[0186] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 nmol/kg do indivíduo e 20 nmol/kg do indivíduo.

[0187] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 μ mol/kg do indivíduo e 900 μ mol/kg do indivíduo.

[0188] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 μ mol/kg do indivíduo e 600 μ mol/kg do indivíduo.

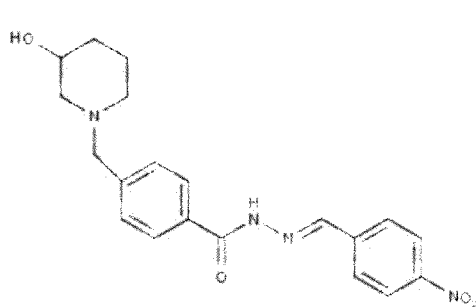
[0189] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 μ mol/kg do indivíduo e 300 μ mol/kg do indivíduo.

[0190] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 μ mol/kg do indivíduo e 100 μ mol/kg do indivíduo.

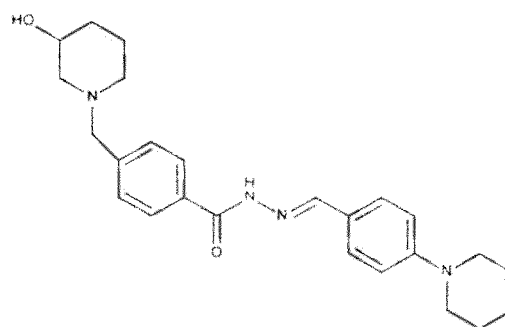
[0191] Em uma concretização, o regime de dose que varia entre 1 μ mol/kg do indivíduo e 20 μ mol/kg do indivíduo.

[0192] Em uma concretização, a dose administrada é 100 μ mol/kg do indivíduo.

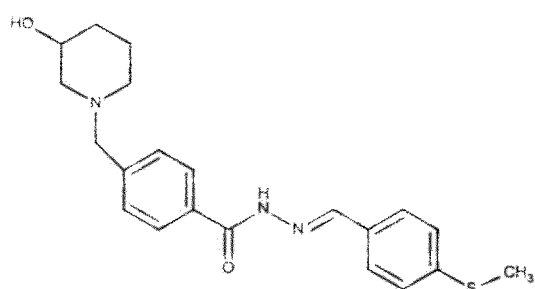
[0193] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula III, fórmula IV, fórmula V, fórmula VIII ou fórmula IX:



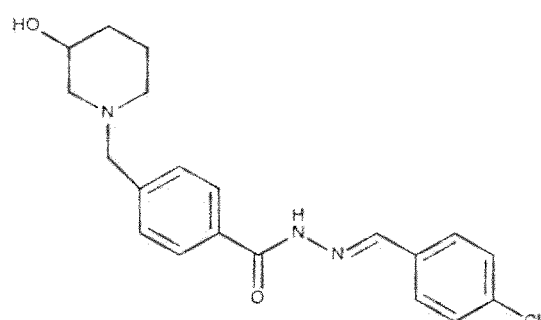
III, (LFQM 57)



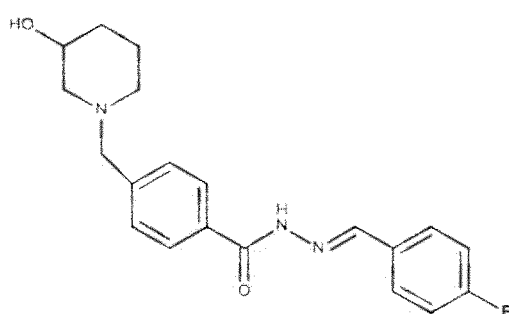
IV, (LFQM 75)



V, (LFQM 88)



VIII, (LFQM 56)

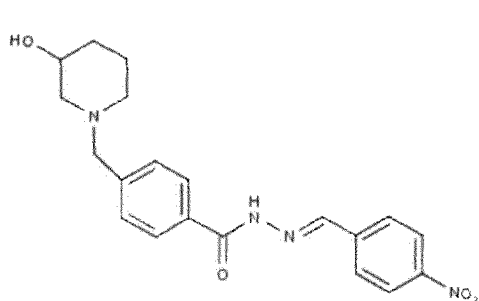


IX. (LFQM 67)

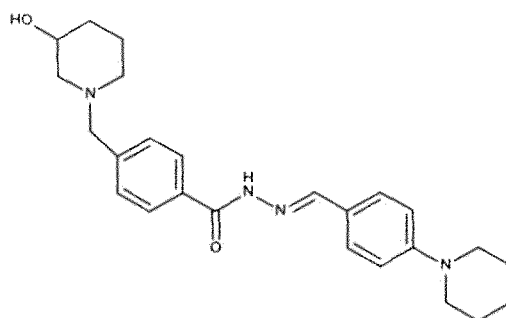
[0194] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um método de tratamento de inflamações que compreende administração de composto conforme definido anteriormente a um indivíduo propenso a ou acometido de inflamação, em um regime de dose que varia entre 1 μ mol/kg do indivíduo e 300 μ mol/kg do indivíduo.

[0195] Em uma concretização, a dose administrada é 100 μ mol/kg do indivíduo.

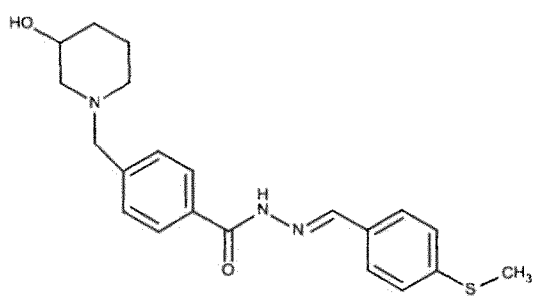
[0196] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula III, fórmula IV, fórmula V, fórmula VI, fórmula VII, fórmula VIII ou fórmula IX:



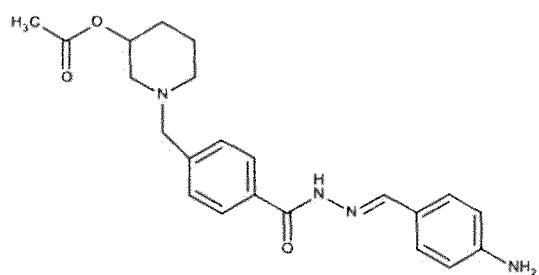
III, (LFQM 57)



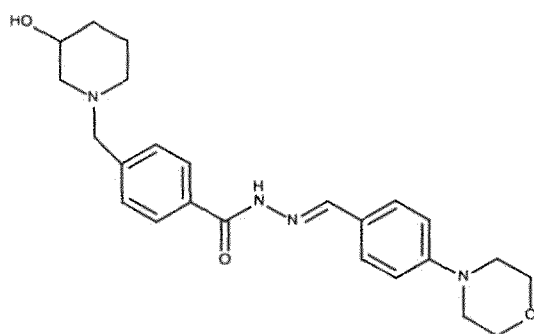
IV, (LFQM 75)



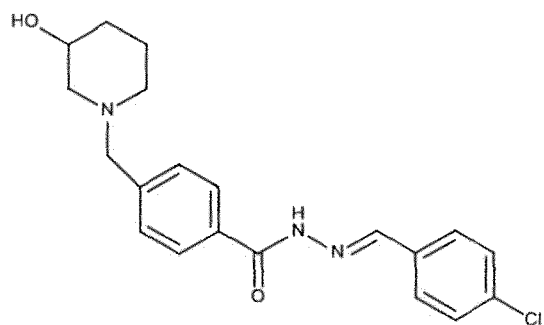
V, (LFQM 88)



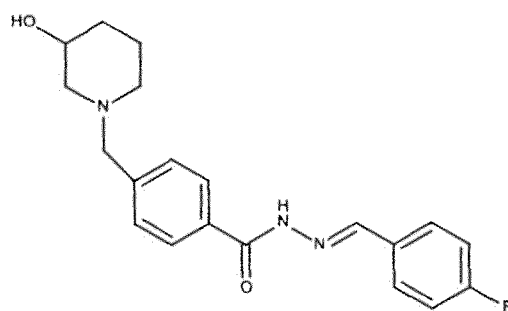
VI, (LFQM 73)



VII, (LFQM 74)

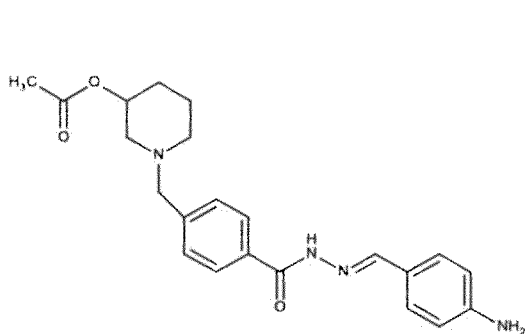


VIII, (LFQM 56)

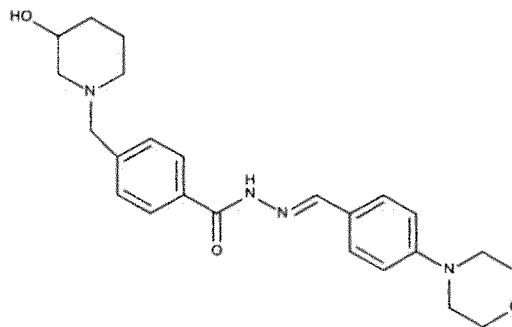


IX. (LFQM 67)

[0197] Em uma concretização o composto é de acordo com a fórmula VI ou fórmula VII:



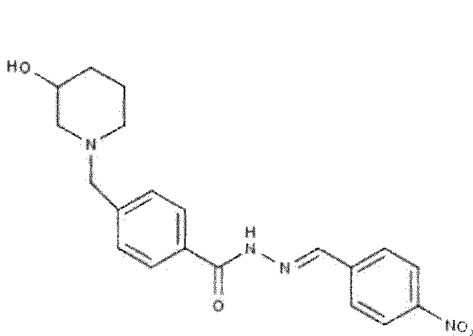
VI, (LFQM 73)



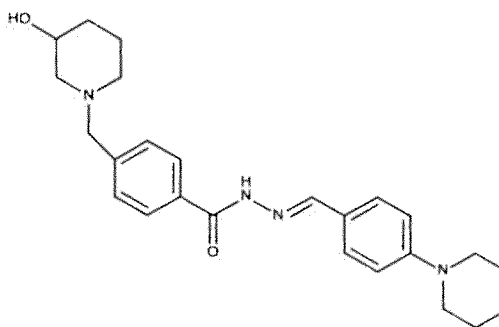
VII, (LFQM 74)

[0198] Em outro objeto, a presente invenção apresenta um método de inibição da enzima acetilcolinesterase que compreende contatar composto conforme definido anteriormente com a enzima acetilcolinesterase.

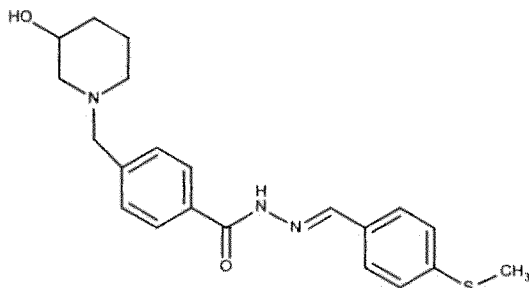
[0199] Em uma concretização, o composto é de acordo com a fórmula III, fórmula IV, fórmula V, fórmula VIII ou fórmula IX:



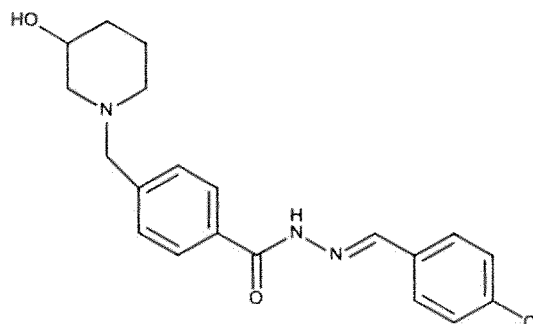
III, (LFQM 57)



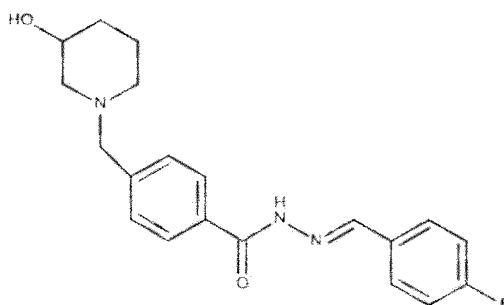
IV, (LFQM 75)



V, (LFQM 88)



VIII, (LFQM 56)



IX. (LFQM 67)

[0200] Na presente descrição, algumas definições serão utilizadas, sendo a seguir melhor definidas.

[0201] Solvente clorado

[0202] No contexto do presente pedido de patente, solvente clorado deve ser entendido como qualquer tipo de solvente adequado para reações orgânicas como, por exemplo, tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, dentre outros.

[0203] Solvente não clorado

[0204] No contexto do presente pedido de patente, solvente não clorado deve ser entendido como solventes que compreendem acetonitrila, éteres e toluenos, dimetilformamida, dentre outros.

[0205] Composto transferidor de grupo halogênio

[0206] No contexto do presente pedido de patente, composto transferidor de grupo halogênio deve ser entendido como qualquer reagente que possua a função de realizar transferência de grupo halogênio. Exemplos não limitantes de compostos transferidores de grupo halogênio incluem cloreto de oxalila, cloreto de tionila, PCl_5 , PCl_3 , PBr_5 , PBr_3 , dentre outros.

[0207] Álcool primário, secundário ou terciário

[0208] No contexto do presente pedido de patente, álcool primário, secundário ou terciário compreendem álcoois como metanol, etanol, propanol, butanol, isopropanol, isobutanol, pentanol, isopentanol, dentre outros.

[0209] Ácido de Lewis

[0210] No contexto do presente pedido de patente, ácidos de Lewis compreendem ácidos como cloreto de zinco (ZnCl_2), cloreto de alumínio (AlCl_3), cloreto de ferro (III), dentre outros.

[0211] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar algumas das inúmeras maneiras de se concretizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1: Processo de síntese e caracterização dos compostos obtidos

[0212] Foi sintetizada uma nova série de derivados análogos ao donepezil, planejados por hibridação molecular com o protótipo LASSBio- 767 e com derivados alcaloídicos arilidrazônicos com atividade anti-inflamatória, contemplando a subunidade W-benzil-piperidínica do donepezil e uma subunidade espaçadora W-acilidrazona, descrita como um importante biofóro anti-inflamatório. Além disso, a variação dos substituintes do núcleo benzílico, visava fornecer importantes informações de relação estrutura-atividade, num provável perfil duplo ou simbiótico das novas moléculas, que poderiam atuar como anticolinesterásicos e como anti-inflamatórios, sendo tanto o mecanismo de ação, como o padrão estrutural, inéditos na literatura (Figura 1).

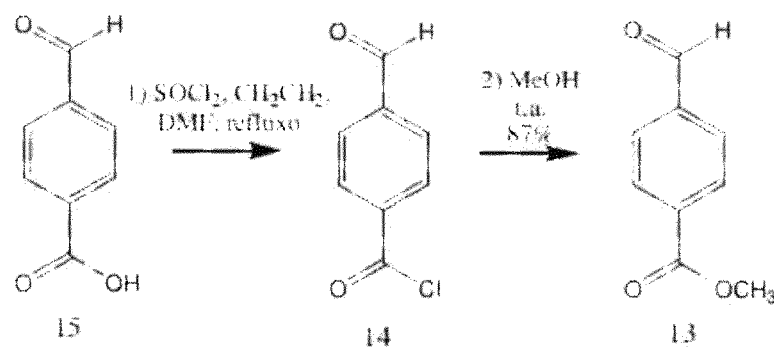
[0213] 1.1) Processo de síntese

[0214] Foram sintetizadas 18 substâncias novas com base na rota sintética apresentada na Figura 2, a partir do 4-carbóxi-benzaldeído e da 3-hidroxipiperidina (Figura 2). Numa etapa inicial, uma reação de esterificação do ácido (**15**) em diclorometano na presença de cloreto de tionila (SOCl_2) e de dimetilformamida (DMF) originaria o cloreto de ácido (**14**) que, ao ser reagido com metanol, poderia ser transformado no éster (**13**). Na segunda etapa sintética, uma reação de aminação redutiva entre (**12**) e (**13**), na presença de $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{ZnCl}_2/\text{MeOH}$ poderia fornecer o éster N-benzilpiperidínico (**11**), que submetido à reação com monohidrato de hidrazina originaria a hidrazida (**10**), intermediário-chave na rota sintética proposta. A hidrazida (**10**), ao reagir com

uma série de benzaldeídos substituídos (**9**) deveria gerar a série de N-acilidrazonas-alvo, com diferentes substituintes no anel aromático da subunidade N-acilidrazonil-benzílica. Para a obtenção das acilidrazonas acetiladas (LFQM-58, LFQM-68, LFQM-73, LFQM-84 e LFQM-87), uma etapa adicional com uma reação de acetilação com anidrido acético e 4-(N,N-dimetilamino)piridina (4-DMAP) e completaria a sequência sintética desejada. Os compostos obtidos foram caracterizados por espectrometria no IV, MS e RMN.

[0215] O 4-carboxibenzaldeído (**15**), eleito como material de partida para a síntese das moléculas-alvo, foi convertido no cloreto de acila (**14**) por reação com SOCl_2 , catalisada por DMF, seguida de uma etapa de metanólise (Esquema 1).⁹⁹ O produto bruto da reação foi purificado em coluna cromatográfica, fornecendo o éster 4-formilbenzoato de metila (**13**) em 87% de rendimento.

[0216] **Esquema 1.** Reação de conversão do 4-carboxibenzaldeído (**13**) em cloreto de acila (**14**), seguida de metanólise para a obtenção do éster 4-formilbenzoato de metila (**12**).



[0217] O espectro de infravermelho (IV) do éster (**13**) (Figura 3) não apresenta a banda de ν_{OH} , entre 3300 e 2500 cm^{-1} , característica do 4-carboxibenzaldeído, o que indica que ocorreu a conversão do material de partida. É possível observar duas bandas características $\nu_{\text{C-H}}$ de aldeídos em 2835 e em 2735 cm^{-1} ; bandas de $\nu_{\text{C-H}}$ de metila em 2997 e

2954 cm^{-1} ; em 1724 e 1707 cm^{-1} aparecem duas bandas sobrepostas de $\text{C}=\text{O}$ referente às carbonilas das funções éster e aldeído, respectivamente. Em 1280 e 1111 cm^{-1} podem ser observadas as bandas características do $\text{C}-\text{O}$ da função éster

[0218] O éster (**13**) mostrou-se, aparentemente, pouco estável em temperatura ambiente, apresentando sinais de degradação quando observado em placa cromatográfica, pelo surgimento de outra substância não identificada, porém sem alterações no aspecto visual do produto puro. A análise por espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C e de massas de alta resolução, confirmou a instabilidade observada. No espectro de RMN de ^1H (Figura 4), aparece um singleto em δ 3,88, que foi atribuído a um grupo metila do produto de decomposição, assim como alguns sinais na região de aromáticos (δ 120,0-140,0 ppm) do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5), de menor intensidade que os atribuídos ao éster (**13**). As evidências de contaminação por degradação foram corroboradas pelo espectro de massas (Figura 6), que apresentou grande número de sinais relativos, provavelmente a fragmentações do éster (**13**) e de seu produto de degradação.

[0219] No espectro de RMN de ^1H (Figura 4), foram observados os sinais referentes à estrutura do éster (**13**), porém, com outros sinais indicativos da presença de impureza como, por exemplo, em δ 5,55; δ 1,26 e δ 7,58, o que foi atribuído a um produto estruturalmente análogo de degradação. O sinal em δ 4,87 se refere à presença de água no MeOH^{100} e, em δ 3,30 é o sinal referente ao solvente utilizado no experimento.

[0220] No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5), foram observados o sinal em δ 191,6 referente ao C carbonílico do grupamento aldeídico e o sinal em δ 166,4 do C carbonílico da função éster. O sinal referente ao C metílico da metoxila pode ser observado em δ 51,7, assim como os sinais de CH aromáticos na região de δ 120-140,0. Assim como no espectro de RMN de ^1H , existem sinais que não correspondem ao produto de interesse, sendo assim, pode-se atribuí-los ao produto de degradação.

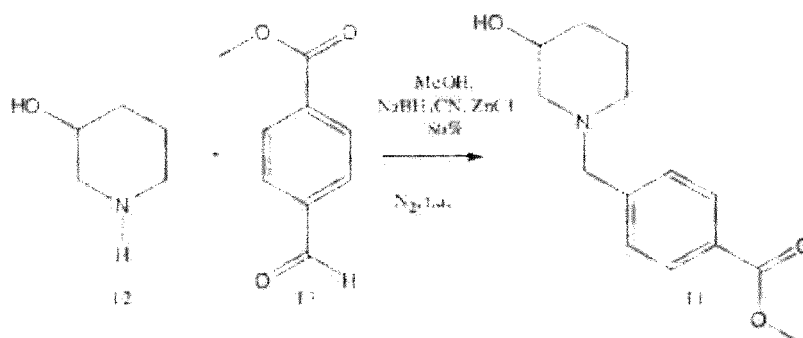
[0221] **Tabela 1.** Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do 4-formilbenzoato de metila (13).

Posição	δ ^1H (ppm)	m	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	--	--	---	139,0
2	7,97	d	10,00	128,4
3	8,16	d	8,00	129,2
4	--	--	---	134,6
5	8,16	d	8,00	128,7
6	7,97	d	10,00	128,5
7	10,06	s	---	191,6
8	--	--	---	166,4
9	3,93	s	---	51,7

[0222] No espectro de massas de alta resolução (Figura 6), pode-se observar o pico referente ao [dímero (13)-1]⁺ com $m/z = 327.2270$, o que confirma a obtenção do éster desejado, porém impuro conforme discutido anteriormente.

[0223] Numa etapa subsequente, o éster (13) foi convertido na N-benzilpiperidina (11), com rendimento de 86%, por reação de aminação redutiva entre a 3- hidroxipiperidina comercial (12) e o formil-éster (13) (Esquema 2).

[0224] **Esquema 2.** Reação de aminação redutiva entre a 3- hidroxipiperidina (12) e o formil-éster 13



[0225] A técnica de aminação redutiva utilizada consistiu na preparação de uma solução metanólica do éster (13) com a amina (12). Em outro balão, foram agitados NaBH₃CN e ZnCl₂ anidro em MeOH. As duas soluções foram mantidas sob agitação em atmosfera de N₂. Após 1h, as duas soluções foram transferidas para um único balão reacional, mantendo-se as condições de temperatura, agitação e atmosfera, até conversão completa do éster de partida.

[0226] O produto 4-((3-hidroxipiperid-1-ila)metil)benzoato de metila (11), foi purificado em coluna cromatográfica e caracterizado por IV, RMN de ¹H, ¹³C e espectrometria de massas.

[0227] Ao analisar o espectro de IV (Figura 7) é possível comprovar a conversão do éster (13) no produto (11) através da presença da banda de us O-H em 3346 cm⁻¹ e da ausência da banda de u_s C-H em 2735 cm⁻¹ característica de aldeído. Observam-se as bandas em 2933 e 2791 cm⁻¹ características de u_s C-H de metila e metileno; a banda u_s C=O em 1716 cm⁻¹ e duas bandas de u_s C-O em 1282 (larga) e 1111 cm⁻¹ característica de ésteres. Em 1282 cm⁻¹ está uma banda alargada provavelmente pela sobreposição das bandas de u_s C-O e u_s C-N.

[0228] A estrutura do produto desejado foi confirmada no espectro de RMN de ¹H (Figura 8), pela presença do singleto em δ 3,55, relativo aos hidrogênios metilênicos H-7, além dos sinais referentes à subunidade piperidínica em δ 1,00-4,0 do grupo metila de éster em δ 3,87 e do conjunto de dupletos relativos aos grupos metínicos aromáticos em δ 7,44 e 7,92. No

espectro de RMN de ^{13}C também foi possível atribuir todos os sinais relativos aos carbonos da estrutura da N- benzilpiperidina (**11**) (Figura 9, Tabela 2).

[0229] **Tabela 2.** Dados de RMN ^1H e ^{13}C do 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoato de metila (**11**).

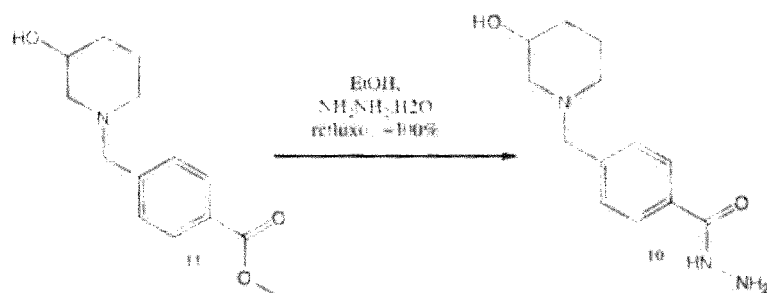
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	m	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	--	--	--	144,8
2	7,94	d	8,00	130,6
3	7,42	d	8,00	130,6
4	--	--	--	130,6
5	7,42	d	8,00	130,6
6	7,94	d	8,00	130,6
7	3,55	s	--	63,5
8	--	--	--	168,3
9	3,87	s	--	52,7
2'	2,00	m	--	61,9
3'	3,64	m	--	67,6
4'	1,54	m	--	33,9
5'	1,84	m	--	24,2
6'	2,84	m	--	54,5

[0230] No espectro de massas (Figura 10), foi identificado o pico-íon-molecular $[\text{M}+1]^+$ do composto em $m/z = 250.1454$. Também foi possível identificar os seguintes picos: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ em $m/z = 272.1267$; $[\text{M} - \text{OH}]^+$ em $m/z = 232.1340$ e $[\text{dímero} + \text{Na}]^+$ em $m/z = 521.2626$.

[0231] Uma vez obtida, a N-benzilpiperidina (**11**) foi, então, convertida na hidrazida (**10**), intermediário-chave na rota sintética proposta para a série-

alvo, via reação de hidrazinólise, com monoidrato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em etanol e sob refluxo.

[0232] Esquema 3. Obtenção da hidrazida (10), a partir da reação do éster (11) com monoidrato de hidrazina.



[0233] Foram feitos os espectros IV, de RMN ^1H e RMN ^{13}C , porém, os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C foram pouco conclusivos visto que os Hs da função hidrazida não apareceram. Mas, a estrutura foi confirmada pelo IV (Figura 11) e pela espectrometria de massas de alta resolução (Figura 14).

[0234] Ao comparar o espectro de IV da hidrazida (10) com o do éster precursor (11), nota-se o deslocamento da banda $\nu_{\text{C=O}}$ de 1716 para 1651 cm^{-1} e não há a banda intensa em 1111 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{C-O}}$ característica de ésteres. No espectro abaixo é possível verificar também uma banda de 5 fora do plano de N-H em 1600 cm^{-1} , o que confirma a obtenção da hidrazida (10).

[0235] Tabela 3: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da 4[(3-hidroxipiperididin-1-il)metil]benzoilidrazida (10).

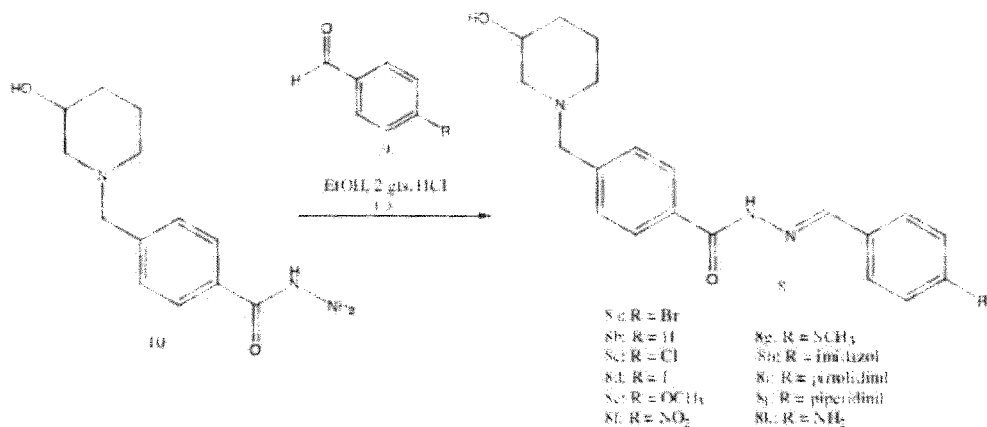
Posição	δ ^1H (ppm)	M	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1	--	--	--	133,4
2	7,75	d	8,00	128,3
3	7,42	d	8,00	130,8
4	--	--	--	142,8

5	7,42	d	8,00	130,6
6	7,75	d	8,00	128,3
7	3,59	s	--	61,9
8	--	--	--	169,5
9	--	--	--	--
10	--	--	--	--
2'	2,86, 2,68	m	--	63,6
3'	3,66	--	--	67,8
4'	1,90	m	--	33,8
5'	1,70	m	--	24,0
6'	2,00	m	--	54,5

[0236] Foi possível confirmar a obtenção da hidrazida **10** por espectrometria de massas, cujo espectro (Figura 14) apresenta pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 250.1556$. Também é possível verificar a presença dos picos referentes ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 272.1373$; $[M-OH]^+$ em $m/z = 232.1446$; $[dímero+Na]^+$ em $m/z = 521.2843$ e o sinal do fragmento relativo à perda do anel piperidínico em $[M-100]^+$ em $m/z = 149.0713$.

[0237] Numa etapa final, a hidrazida (**10**) foi submetida ao acoplamento com uma série de benzaldeídos funcionalizados comerciais (**9**), em etanol, sob catálise de HCl103, para gerar as respectivas 3-hidroxi-(W-benzil)-piperidinilacilidrazonas-alvo em rendimentos de 15-96 % (Esquema 4, Tabela 4).

[0238] **Esquema 4.** Esquema da reação de acoplamento entre a hidrazida (**10**) e aldeídos funcionalizados.



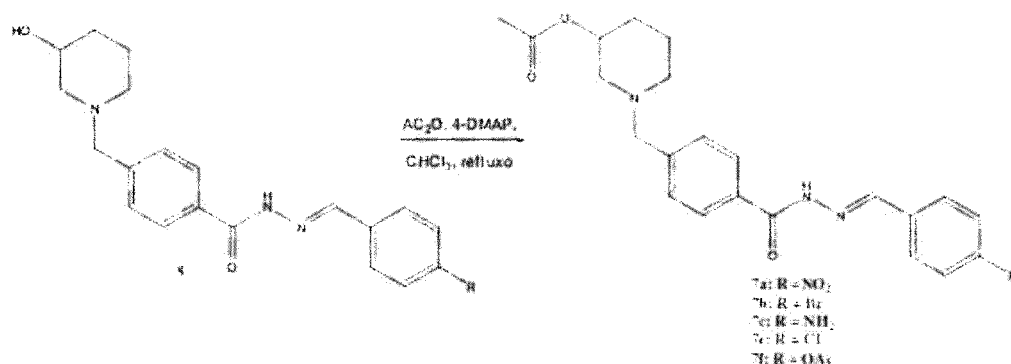
[0239] **Tabela 4.** Dados experimentais da preparação da série de acilidrazonas-alvo 8a-l (LFQM54-57, LFQM-65-67, LFQM-72, LFQM-75, LFQM-76 e LFQM-88).

Substância	R	Rendimento (%)	Intervalo de Fusão (°C)
8b (LFQM-54)	H	32	194-200
8a (LFQM-55)	Br	52	198-203
8c (LFQM-56)	Cl	62	210-215
8f (LFQM-57)	NO ₂	95	210-214
8e (LFQM-65)	OCH ₃	96	193-195
8i (LFQM-66)	Pirrolidinil	94	172-180

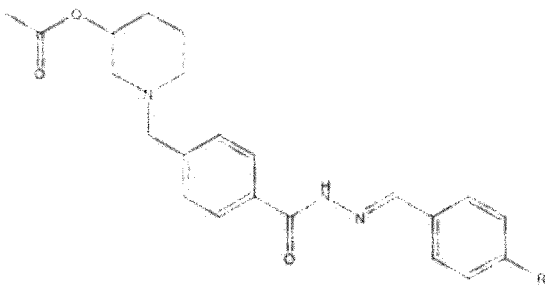
8d (LFQM-67)	F	68	225-232
8k (LFQM-72)	NH ₂	15	125-132
8j (LFQM-75)	Piperidinil	31	178-186
8h (LFQM-76)	Imidazolil	29	152-decomposição
8g (LFQM-88)	SCH ₃	59	195-205

[0240] Visando avaliar a contribuição farmacofórica do grupo hidroxila em C-3 da subunidade piperidínica da série de 3-hidroxi-(W-benzil)-piperidinil-acilidrazonas **8** e, ainda, avaliar a influência do grupo acetila presente na estrutura de LASSBio-767, substância inibidora de AChE utilizada como protótipo na gênese da série-alvo deste projeto, algumas hidroxi-acilidrazonas da série **8** foram convertidas nos respectivos derivados acetilados, por reação com Ac₂O/4-DMAP em CHCl₃¹⁰⁴ (Esquema 5, Tabela 5).

[0241] Esquema 5. Preparação da série de acilidrazonas acetiladas **7** (a-f), por reação de acetilação com Ac₂O, 4-DMAP e CH₂Cl₂.



[0242] Tabela 5. Dados experimentais da preparação da série de acilidrazonas-acetiladas-alvo **7a-f** (LFQM- 58, LFQM-68, LFQM-73, LFQM-84 e LFQM-87).

			
Substância	R	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)
7a (LFQM-58)	NO ₂	84	160-163
7b (LFQM-68)	Br	60	140-150
7c (LFQM-73)	nh ₂	42	220-228
7e (LFQM-84)	Cl	24	100-102
7f (LFQM-87)	OAc	37	145-150

[0243] As análises por ressonância magnética nuclear (RMN) ainda estão sendo realizados em instituições colaboradoras externas (UFRRJ e UFMG) e, nem todos os espectros estão disponíveis. Por outro lado, todas as substâncias das séries 7 e 8 foram caracterizadas por infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução.

[0244] 1.2) Caracterização estrutural das N-benzilpiperidinilacilidrazonas das séries- alvo 7 e 8.

[0245] 1.2.1) N-benzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8b (LFQM- 54)

[0246] O espectro no IV (Figura 15) da substância **LFQM-54** apresenta bandas de u O-H em 3410 cm⁻¹, u N-H em 3172 cm⁻¹, u C-H sp² em 3034 cm⁻¹, u_s C-H sp³ em 2827 cm⁻¹, u_{as} C-H sp³ em 2941 cm⁻¹, u C=O em 1645 cm⁻¹

(Figura 16), pela presença do singleto em δ 8,42 relativo ao hidrogênio 10', além dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e piperidínicos.

[0248] No espectro de RMN¹³C (Figura 17), pode-se observar os sinais em δ 164,6 referente ao C=O, δ 145,6 referente ao C-10 hidrazônico e em δ 56,4 referente ao C-7 mais característicos da estrutura da LFQM-54 além dos sinais referentes aos carbonos aromáticos e piperidínicos.

[0249] No espectro de massas de alta resolução (Figura 18) está apresentado o pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 338,1965$. Também é possível verificar os picos referentes ao $[M+Na+1]^+$ em $m/z = 360,1652$ e ao $[dímero+Na]^+$ em $m/z = 697,3453$.

[0250] 1.2.2) N-(4-bromobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8a (LFQM-55)

[0251] Ao se comparar o espectro no IV da hidrazida (Figura 19) com o espectro de IV da substância **LFQM-55** (Figura 19), nota-se o aparecimento de uma banda em 3232 cm^{-1} referente ao $\nu_{\text{N-H}}$ e o deslocamento de 1651 para 1641 cm^{-1} da banda de $\nu_{\text{C=O}}$ que pode estar relacionado com o acoplamento da hidrazida com o aldeído.

[0252] No espectro de massas de alta resolução (Figura 20) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 416,0967$ e ao $[dímero+Na]^+$ em $m/z = 855,1603$.

[0253] 1.2.3) N- (4-clorobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8c (LFQM-56)

[0254] O espectro no IV (Figura 21) da substância **LFQM-56** apresenta bandas de $\nu_{\text{O-H}}$ em 3408 cm^{-1} , $\nu_{\text{N-H}}$ em 3232 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ em 2854 cm^{-1} , $\nu_{\text{as C-H sp}^3}$ em 2927 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=O}}$ em 1658 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=N}}$ em 1558 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-O}}$ em 1089 cm^{-1} e dentre outras, apresenta a banda referente ao $\nu_{\text{C-Cl}}$ em 756 cm^{-1} .

[0255] No espectro de RMN de ^1H (Figura 22), estão presentes, entre

[0256] No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23), estão presentes, entre outros, os sinais referente ao C-7 em 5 61,0 e, o sinal referente ao C-10' em 5 146,3 ppm.

[0257] **Tabela 7.** Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância LFQM-56.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	m	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	2,74 - 2,79	m	--	62,0
3	--	--	--	66,3
4	1,58 - 1,72	m	--	33,5
5	1,39 - 1,44	m	--	23,3
6	1,76 - 1,87	m	--	53,0
7	3,37	s	--	61,0
1'	--	--	--	135,0
2'	7,87	d	6,00	127,6
3'	7,43	d	8,00	131,0
4'	--	-	--	134,5
5'	7,43	d	8,00	131,0
6'	7,87	d	6,00	127,6
7'	--	--	--	163,3
10'	8,45	s	--	146,3
1''	--	--	--	132,0
2''	7,75	d	8,00	127,6
3''	7,52	d	8,00	130,9
4''				----

6"	7,75	d	8,00	127,6
----	------	---	------	-------

[0258] No espectro de massas de alta resolução (Figura 24) está presente o pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 372,1473$. Também é possível verificar os picos referentes ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 394,1292$, ao [dímero + 1] $^+$ em $m/z = 743,2888$ e ao [dímero + Na] $^+$ em $m/z = 765,2701$.

[0259] 1.2.4) N- (4-nitrobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8f (LFQM-57).

[0260] O espectro no IV (Figura 25) da substância **LFQM-57** apresenta bandas de ν O-H em 3311 cm^{-1} , ν N-H em 3232 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2941 cm^{-1} , ν C=O em 1655 cm^{-1} , ν C=N em 1546 cm^{-1} , ν C-O em 1053 cm^{-1} e dentre outras, apresenta as bandas referente ao ν N=O em 1516 e 1346 cm^{-1} .

[0261] No espectro de massas de alta resolução (Figura 26) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 383,1716$ e ao [dímero + Na] $^+$ em $m/z = 787,3127$.

[0262] 1.2.5) N- (4-metoxibenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8e (LFQM-65).

[0263] O espectro no IV (Figura 27) da substância **LFQM-65** apresenta bandas de ν O-H em 3425 cm^{-1} , ν N-H em 3209 cm^{-1} , ν C-H sp^2 em 3039 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2827 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2931 cm^{-1} , ν C=O em 1643 cm^{-1} , ν C=N em 1604 cm^{-1} , ν C-O em 1056 cm^{-1} e dentre outras, apresenta as bandas referentes ao 5 C-H sp^3 da metila em 1421 e 1371 cm^{-1} .

[0264] A estrutura da **LFQM-65** foi confirmada no espectro de RMN 1 H (Figura 28), pelos singletos em δ 8,36 relativo ao hidrogênio 10' e δ 3,87 relativo à metila 8" , além dos sinais referentes ao hidrogênios aromáticos e piperidínicos.

[0265] No espectro de RMN 13 C (Figura 29), pode-se observar o sinal em δ 164,9 referente ao carbono carbonílico, o sinal em δ 54,5 referente ao

[0266] Tabela 8. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância LFQM-65

Posição	δ ¹ H (ppm)	m	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
2	3,07	m	--	54,6
3	4,10	m	--	--
4	1,50 - 2,0	m	--	--
5	1,50 - 2,00	m	--	--
6	1,50 - 2,00	m	--	53,0
7	--	--	--	60,9
1'	--	--	--	129,2
2'	8,00	d	10,00	129,2
3'	7,62	d	5,00	130,4
4'	--	-	--	129,2
5'	7,62	d	5,00	130,4
6'	8,00	d	10,00	129,2
7'	--	--	--	165,0
8'	--	--	--	--
10'	8,36	s	--	149,6
1''	--	--	--	126,6
2''	7,81	d	10,00	130,4
3''	7,01	d	10,00	113,9
4''	--	--	--	162,0
5''	7,01	d	10,00	113,9

7 ⁿ	--	--	--	--
8	3,87	s	--	54,5

[0267] No espectro de massas de alta resolução (Figura 30) foi identificado o pico referente ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 368,1967$. Também é possível verificar a presença do pico referente a perda da subunidade piperidínica $[M-100]^+$ em $m/z = 267,1130$ e do pico referente ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 390,1779$.

[0268] 1.2.6) N- (4-(pirrolidin-1-ila)benzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-

[0269] ila)metil)benzoidrazida: 8i (LFQM-66).

[0270] O espectro no IV (Figura 31) da substância **LFQM-66** apresenta bandas de u O-H em 3427 cm^{-1} , u_{as} C-H sp^3 em 2922 cm^{-1} , u_s C-H sp^3 em 2850 cm^{-1} , u C=O em 1651 cm^{-1} e entre outras a banda referente ao u C=N em 1593 cm^{-1} .

[0271] No espectro de massas de alta resolução (Figura 32) estão identificados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 407,2442$, ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 429,2276$ e ao [dímero + Na]⁺ em $m/z = 813,4803$.

[0272] 1.2.7) N- (4-fluorbenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8d (LFQM-67).

[0273] O espectro no IV (Figura 33) da substância **LFQM-67** apresenta bandas de u O-H em 3408 cm^{-1} , u N-H em 3213 cm^{-1} , u C-H sp^2 em 3043 cm^{-1} , u_{as} C-H sp^3 em 2941 cm^{-1} , u C=O em 1649 cm^{-1} e dentre outras apresenta a banda referentes ao u C=N em 1604 cm^{-1} .

[0274] No espectro de RMN de ^1H (Figura 34) observa-se entre outros sinais, o singleto referente ao H-10' em δ 8,60 e o singleto referente ao H-7 em δ 3,39 ppm.

[0275] No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35) observa-se entre outros sinais, o sinal referente ao C-10' em δ 143,8 o sinal referente ao C-7 em δ 59,5 e o

Posição	δ ^1H (ppm)	m	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	3,04	m	--	62,2
3	3,84	m	--	72,0
4	1,77 - 1,91	m	--	33,2
5	1,77 - 1,91	m	--	21,4
6	1,77- 1,91	m	--	52,9
7	3,39	s	--	59,5
1'	--	--	--	131,3
2'	8,02	d	8,00	123,3
3'	7,77	m	--	128,2
4'	--	-	--	138,7
5'	7,77	m	--	128,2
6'	8,02	d	8,00	123,4
7'	--	--	--	162,4
10'	8,60	s	--	143,8
1''	--	--	--	129,5
2''	7,77	m	--	130,5
3''	7,33	d	8,00	115,1
4''	--	--	--	165,0
5''	7,33	d	8,00	115,1
6''	7,77	m	--	130,5

[0278] 1.2.8) N- (4-aminobenzilideno-4-((3-hidroxipiperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8k (LFQM-72)

[0279] O espectro no IV (Figura 37) da substância **LFQM-72** apresenta a duas bandas características de amins primárias u N-H em 3348 cm^{-1} e 3228 cm^{-1} , u C-H sp^3 em 2852 cm^{-1} , u_{as} C-H sp^3 em 2922 cm^{-1} , u C=O em 1651 cm^{-1} , u C=N em 1597 cm^{-1} e entre outras, u C-O em 1056 cm^{-1} .

[0280] A estrutura da **LFQM-72** foi confirmada no espectro de RMN ^1H (Figura 38), pelo singlete em δ 8,17 e em δ 3,62 relativos aos hidrogênios 10' e 7, respectivamente, além dos sinais referentes ao hidrogênios aromáticos e piperidínicos.

[0281] No espectro de RMN ^{13}C (Figura 39), pode-se observar o sinal em δ 164,9 referente ao carbono carbonílico, em δ 60,4 está o sinal referente ao C-7 e, entre outros, é possível observar em δ 141,4 referente ao C-10.

[0282] Tabela 10. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância LFQM-72

Posição	δ ^1H (ppm)	m	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,67 - 2,68	m	--	61,9
3	3,25	s	--	66,1
4	1,26 - 2,13	m	--	32,1
5	1,26 - 2,13	m	--	22,3
6	1,26 - 2,13	m	--	52,9
7	3,62	S	--	60,4
1'	--	--	--	132,0
2'	7,86	d	8,00	129,1
3'	7,48	m	-	129,4
4'	--	--	--	140,0

6'	7,86	d	8,00	129,1
7'	--	--	--	164,9
8'	--	--	--	--
10'	8,17	s	--	141,4
1"	--	--	--	122,4
2"	7,48	m	--	129,4
3"	6,67	d	8,00	114,0
4"	--	--	--	151,0
5"	6,67	d	8,00	114,0
6"	7,48	m	--	129,4
7"	--	--	--	--

[0283] No espectro de massas de alta resolução (Figura 40) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 353,1971$, ao pico $[M+Na]^+$ em $m/z = 375,1751$, ao $[dímero + 2 Na]^+$ em $m/z = 727,3665$ e ao $[dímero + Na + 1]^+$ em $m/z = 705,3840$.

[0284] 1.2.9) N-((4-piperidi-1-ila)benzilideno)-4-((3-hidroxi-piperidin-1-ila)metil)benzoidrazida: 8h (LFQM-75)

[0285] O espectro no IV (Figura 41) da substância **LFQM-75** apresenta bandas de ν O-H em 3446 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2852 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2924 cm^{-1} , ν C=O em 1651 cm^{-1} , ν C=N em 1604 cm^{-1} e, dentre outras, apresenta a banda referente ao δ C-H sp^3 dos carbonos metilênicos em 1460 cm^{-1} .

[0286] No espectro de RMN de 1H (Figura 42) é possível observar entre outros sinais, o singlete em δ 3,58 referente ao H-7 e o singlete referente ao H-10'.

em 5 145,1 e o sinal do carbono carbonílico em 5 163,1 ppm.

[0288] Tabela 11. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância LFQM-75

Posição	δ ¹ H (ppm)	m	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
2	3,22	--	--	64,0
3	2,90	--	--	69,4
4	1,76	--	--	31,9
5	1,17	--	--	21,5
6	1,90	--	--	54,5
7	3,58	s	--	61,0
1'	--	--	--	131,1
2'	7,97	d	10,00	124,1
3'	7,57	d	8,00	128,5
4'	--	-	--	139,2
5'	7,57	d	8,00	128,5
6'	7,97	d	10,00	124,1
7'	--	--	--	163,1
10'	8,44	s	--	145,1
1''	--	--	--	123,8
2''	7,83	d	8,00	131,1
3''	6,91	d	8,00	115,00
4''	--	--	--	154,2
5''	6,91	d	8,00	115,0

3'''	1,55	s	--	25,3
4'''	1,55	s	--	25,3
5'''	1,55	s	--	25,3
6'''	2,13	--	--	50,3

[0289]

[0290] No espectro de massas de alta resolução (Figura 44) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 421,2596$, ao pico $[M+Na]^+$ em $m/z = 443,2388$, ao $[dímero + 1]^+$ em $m/z = 841,5092$ e ao $[dímero + Na]^+$ em $m/z = 853,4907$.

[0291] 1.2.10) N- ((1 -H-imidazol-4-ila)metileno)-4-((3-hidróxipiperidin-1 -

[0292] ila)metil)benzoidrazida: 8h (LFQM-76)

[0293] O espectro no IV (figura 45) da substância **LFQM-76** apresenta bandas de ν O-H em 3431 cm^{-1} , ν_s C-H sp^3 em 2899 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2933 cm^{-1} , ν C=O em 1647 cm^{-1} e, entre outras, apresenta ν C=N em 1610 cm^{-1} .

[0294] No espectro de massas de alta resolução (Figura 46) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 328,1765$ e ao pico $[M+Na]^+$ em $m/z = 350,1590$.

[0295] 1.2.11) N- (4-(metiltio)benzilideno)-4-((3-hidróxipiperidin-1-

[0296] ila)metil)benzohidrazida: 8g (LFQM-88)

[0297] O espectro no IV (Figura 47) da substância **LFQM-88** apresenta bandas de ν O-H em 3406 cm^{-1} , ν N-H em 3250 cm^{-1} , ν_{as} C-H sp^3 em 2939 cm^{-1} , ν C-S em 2694 cm^{-1} , ν C=O em 1643 cm^{-1} , ν C=N em 1608 cm^{-1} , ν C-O em 1056 cm^{-1} e dentre outras, apresenta as banda referente ao 5 C-H sp^3 da metila em 1400 e 1371 cm^{-1} .

[0298] A estrutura da **LFQM-88** foi confirmada no espectro de RMN¹H (Figura 48), pelos singletos em δ 8,31 relativo ao hidrogênio 10', em δ 3,26 relativo ao hidrogênio H-7 e, em δ 2,48 referente à metila 8'' característica da estrutura descrita

C-10' e, entre outros, em δ 59,8 está o sinal referente ao C-7.

[0300] Tabela 12. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância LFQM-88

Posição	δ ¹ H (ppm)	M	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
2	2,01	m	--	59,9
3	2,8	m	--	69,5
4	1,72	m	--	30,5
5	1,65	m	--	24,6
6	--	--	--	53,0
7	3,26	s	--	59,8
1'	--	--	--	130,9
2'	7,98	d	12,00	128,0
3'	7,65	m	-	130,3
4'	--	--	--	137,3
5'	7,65	m	--	130,3
6'	7,98	d	12,00	128,0
7'	--	--	--	165,0
10'	8,31	s	--	143,0
1''	--	--	--	128,0
2''	7,25	d	6,00	130,3
3''	7,65	m	--	125,3
4''	--	--	--	143,0
5''	7,65	m	--	125,3

[0301] No espectro de massas de alta resolução (Figura 50) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 354,1756$, ao [dímero + 1] $^+$ em $m/z = 767,3388$ e ao [dímero + Na] $^+$ em $m/z = 789,3199$.

[0302] 1.3) Caracterização estrutural das N-benzilpiperidinilacilidrazonas o-acetiladas

[0303] 1.3.1) W-(4-nitrobenzilideno)-4-[(3-0-acetilpiperidin-1-il)metil]benzoidrazida: 7a (LFQM-58)

[0304] O espectro no IV (Figura 51) da substância **LFQM-58** não apresenta a banda de u O-H o que confirma a conversão do grupo -OH em -Oacetilado. É possível verificar a presença das seguintes bandas: u N-H em 3425 cm^{-1} , u C-H sp^2 em 3035 cm^{-1} , u_{as} C-H sp^3 em 2941 cm^{-1} , u_s C-H sp^3 em 2802 cm^{-1} , u C=O de éster em 1735 cm^{-1} , u C=O em 1670 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao u N=O em 1543 e 1387 cm^{-1} .

[0305] No espectro de massas de alta resolução (Figura 52) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 425,1813$ e ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 447,1607$.

[0306] 1.3.2) W-(4-bromobenzilideno)-4-[(3-0-acetilpiperidin-1-il)metil]benzoidrazida: 7b (LFQM-68)

[0307] No espectro no IV (Figura 53) da substância **LFQM-68** é possível verificar a presença das seguintes bandas: u N-H em 3232 cm^{-1} , u C-H sp^2 em 3053 cm^{-1} , u_{as} C-H sp^3 em 2943 cm^{-1} , u_s C-H sp^3 em 2798 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de duas bandas distintas de carbonila: u C=O em 1734 cm^{-1} e em 1649 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao u C-O em 1204 e 1244 cm^{-1} .

[0308] No espectro de massas de alta resolução (Figura 54) estão presentes os picos referentes ao íon molecular $[M+2]^+$ em $m/z = 460,1058$, ao $[M+Na+1]^+$ em $m/z = 482,0868$ e ao [dímero + 1] $^+$ em $m/z = 917,2051$.

[0310] No espectro no IV (Figura 55) da substância **LFQM-73** é possível verificar a presença das seguintes bandas: u N-H de amina primária em 3446 e 3350 cm^{-1} , u N- H de amina secundária em 3217 cm^{-1} , u C-H sp^2 em 3032 cm^{-1} , u_{as} C-H sp^3 em 2943 cm^{-1} , us C-H sp^3 em 2802 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de duas bandas distintas de carbonila: u C=O em 1722 cm^{-1} e em 1649 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao u C=O em 1264 e 1248 cm^{-1} .

[0311] A estrutura da **LFQM-73** foi confirmada no espectro de RMN¹H (Figura 56), pelos singletos em δ 8,20 relativo ao hidrogênio 10' e em δ 2,04 referente a metila 10, além dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e piperidínicos.

[0312] No espectro de RMN¹³C dept Q (Figura 57), pode-se observar o sinal em δ 170,9 referente ao carbono carbonílico C-9 do grupamento acetila, sinal em δ 165,8 referente ao carbono carbonílico C-7', o sinal em δ 62,0 referente ao carbono C-7 e, entre outros, apresenta o sinal em δ 19,7 referente ao carbono da metila C-10.

[0313] **Tabela 13.** Dados de RMN¹H e ¹³C dept Q da substância LFQM-73.

Posição	δ ¹ H (ppm)	m	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
2	2,84; 2,67	m	--	56,4
3	4,83	m	--	69,4
4	1,91; 1,82	m	--	29,0
5	1,49; 1,31	m	--	22,1
6	2,30	m	--	52,9
7	3,67	s	--	62,0
9	--	--	--	170,9
--	--	--	--	--

2'	7,90	d	5,00	127,3
3'	7,51	d	10,00	129,2
4'	--	--	--	141,5
5'	7,51	d	10,00	129,2
6'	7,90	d	5,00	127,3
7'	--	--	--	165,8
10'	8,20	s	--	150,5
1"	--	--	--	114,1
2"	7,60	d	5,00	129,2
3"	6,72	d	5,00	113,4
4"	--	--	--	151,1
5"	6,72	d	5,00	113,4
6"	7,6	d	5,00	129,2

[0314] No espectro de massas de alta resolução (Figura 58) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 395,2077$ e ao pico referente a perda do grupamento piperidinilacetila ($m/z = 143$) $[M+143 + Na]^+$ em $m/z = 274,2746$.

[0315] 1.3.4) W-(4-clorobenzilideno)-4-[(3-0-acetilpiperidin-1-il)metil)benzoidrazida: 7e (LFQM-84)

[0316] No espectro no IV (Figura 59) da substância **LFQM-84** é possível verificar a presença das seguintes bandas: u N-H em 3226 cm^{-1} , u C-H sp^2 em 3047 cm^{-1} , uas C- H sp^3 em 2949 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de duas bandas distintas de carbonila: u C=O em 1735 cm^{-1} e em 1653 cm^{-1} e dentre outras, apresenta as bandas

observam-se entre outros sinais, o singlete referente à metila da subunidade acetato em δ 1,22 e o singlete referente ao H-10' em δ 8,73 ppm.

[0318] No espectro de RMN de ^{13}C da substância **LFQM-84** (Figura 61) observam-se entre outros sinais, o sinal referente à metila da subunidade acetato em δ 22,5, o sinal em referente ao C-10' em δ 143,4, os sinais referentes aos carbonos carbonílicos C-7' em δ 162,3 e C-9 em δ 172,4 ppm.

[0319] **Tabela 14.** Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância LFQM-84.

Posição	δ ^1H (ppm)	m	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,19	m	--	56,4
3	3,84	m	--	67,7
4	1,90 - 1,98	--	--	29,7
5	1,90- 1,98	--	--	16,4
6	1,90 - 1,98	--	--	54,8
7	3,35	s	--	60,8
9	--	--	--	172,4
10	1,22	s	--	22,5
1'	--	--	--	132,0
2'	7,91	d	8,00	127,5
3'	7,57	m	--	131,0
4'	--	--	--	139,0
5'	7,57	m	--	131,0
6'	7,91	d	8,00	127,5
7'	--	--	--	162,3

2"	7,91	d	8,00	133,7
3"	7,69	d	8,00	128,6
4"	--	--	--	136,6
5"	7,69	d	8,00	128,6
6"	7,91	d	8,00	133,7

[0320] No espectro de massas de alta resolução (Figura 62) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 414,1575$, ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 436,1361$ e ao $[\text{dímero} + Na]^+$ em $m/z = 849,2846$.

[0321] 1.3.5) W-(4-O-acetilbenzilideno)-4-[(3-O-acetilpiperidin-1-il)metil)benzoidrazida: 7f (LFQM-87)

[0322] No espectro no IV (Figura 63) da substância **LFQM-87** é possível verificar a ausência da banda de u O-H e a presença das seguintes bandas: u N-H em 3248 cm^{-1} , u C-H sp^2 em 3070 cm^{-1} , u_{as} C-H sp^3 em 2947 cm^{-1} , u_s C-H sp^3 em 2798 cm^{-1} . É possível confirmar a obtenção do produto desejado pela presença de três bandas distintas de carbonila: u C=O em 1762, 1732 e, em 1656 cm^{-1} , e dentre outras, apresenta as bandas referente ao u C=O em 1282, 1251, 1222 e 1197 cm^{-1} .

[0323] No espectro de massas de alta resolução (Figura 64) estão apresentados os picos referentes ao íon molecular $[M+1]^+$ em $m/z = 438,2023$, ao $[M+Na]^+$ em $m/z = 460,1814$, ao $[\text{dímero} + 1]^+$ em $m/z = 875,3948$ e ao $[\text{dímero} + Na]^+$ em $m/z = 897,3774$.

Exemplo 2: Avaliação farmacológica

[0324] 2.2.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica, seletividade e mecanismo de ação

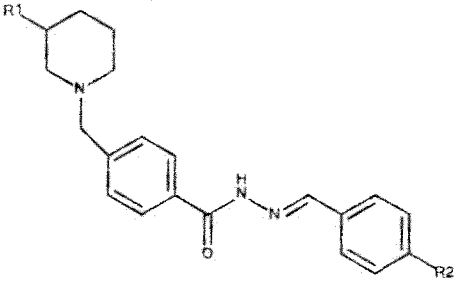
[0325] Todas as 18 novas acilidrazonas obtidas LFQM-54-58. LFQM-

avaliadas, *in vitro* quanto à capacidade inibitória de AChE, inicialmente na concentração 100 μM , utilizando o protocolo de Ellman modificado e a AChE comercial purificada de *Electrophorus electricus*. Os resultados revelaram que os derivados acilidrazônicos hidroxilados na subunidade piperidínica apresentaram maior potência anticolinesterásica, com atividade inibitória da AChE entre 65-91 % na dose de teste (Tabela 1).

[0326] As 13 substâncias que apresentaram inibição acima de 60% foram selecionadas para determinação das curvas dose-resposta, potência inibitória e afinidade pela AChE. A determinação da curva dose-resposta revelou as substâncias mais potentes da série frente à inibição da AChE, sendo LFQM-57 a mais potente (IC_{50} = 2,71 μM), seguida de LFQM-67 (IC_{50} = 8,65 μM), LFQM-88 (IC_{50} = 10,39 μM), LFQM-75 (IC_{50} = 10,89 μM), LFQM-55 (IC_{50} = 11,89 μM), LFQM-65 (IC_{50} = 13,19 μM) e LFQM-66 (IC_{50} = 14,73 μM , Tabela 1).

[0327] A determinação dos valores de K_i para as moléculas mais ativas confirmou LFQM-57, LFQM-88 e LFQM-75 como os ligantes de maior afinidade pela AChE (Tabela 1).

[0328] **Tabela 1:** Efeito *in vitro* da série de acilidrazonas análogas ao donepezil (100 μM) no ensaio de inibição da AChE

					
Substância	R1	R2	% de inibição	IC_{50} (μM)	K_i (μM)
LFQM-54	OH	H	65.3	30.01	-

LFQM-57	OH	NO2	91, 7	2,71	2,4
LFQM-65	OH	OCH3	76, 9	13,19	11,5
LFQM-66	OH	Pirrolidini	75, 2	14,73	-
LFQM-67	OH	F	78, 8	8,65	13,4
LFQM-72	OH	NH2	67, 6	21,46	-
LFQM-74	OH	Morfolinil	81, 9	>100	-
LFQM-75	OH	Piperidini	81, 8	10,89	9,7
LFQM-76	OH	Imidazol	81, 1	21,71	21,4
LFQM-88	OH	SCH3	81, 3	10,39	8,4
LFQM-58	OAc	NO2	60, 7	33,56	-
LFQM-68	OAc	Br	29, 6	>100	-
LFQM-73	OAc	NH2	25, 7	>100	-
LFQM-83	OAc	H	39, 8	>100	-
LFQM-84	OAc	Cl	26, 4	>100	-
LFQM-87	OAc	OAc	32, 8	>100	-

[0329] As substâncias LFQM-56, LFQM-57, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-75, LFQM-76 e LFQM-88 foram, então, submetidas a um estudo de seletividade AChE x BUCHE e do mecanismo de ação, cujos resultados são mostrados nas Figuras 65 e 66.

[0330] O ensaio de seletividade *in vitro* mostrou que, de forma geral, as substâncias testadas são seletivas para a acetilcolinesterase com exceção da LFQM-67 que demonstrou inibir ambas as enzimas de modo semelhante. Merecem destaque as substâncias LFQM-57, LFQM-75 e LFQM-88 que apresentaram os maiores índices de seletividade neste ensaio.

[0331] Na avaliação do modo de inibição da AChE, o perfil dos gráficos obtidos para todas as substâncias avaliadas foi o mesmo e indicou que a inibição da enzima ocorre por um mecanismo não-competitivo simples. Neste tipo de mecanismo, a velocidade é diminuída em função da queda da concentração da enzima ativa causada pela ação do inibidor que não

diferente do sítio de ligação do substrato (Figura 66).

[0332] 2.2.2. Avaliação *in vivo* da atividade sobre a amnésia colinérgica no modelo de reconhecimento de objeto novo

[0333] Nestes ensaios foram utilizados camundongos suíços, tratados com volume igual a 1 mL/100 g de massa corporal pelas vias de administração intraperitoneal (i.p) e oral (v.o). A escopolamina e o donepezil, utilizados nos experimentos foram dissolvidos diretamente em solução salina (NaCl 0,9%) e as substâncias-teste foram dissolvidas em polissorbato 80 na concentração de 5%.

[0334] 2.2.2.1. Reconhecimento de Objeto Novo

[0335] A tarefa de reconhecimento de objeto novo foi conduzida em uma arena circular (40 cm diâmetro x 30 cm altura) com o fundo e as paredes pretas e em ambiente de penumbra. Durante 3 dias consecutivos foi realizada a ambientação dos animais às condições experimentais, colocando-os na arena para livre exploração do ambiente por um período de 10 min a cada dia. No quarto dia, foram realizadas a sessão treino e a sessão teste. Na sessão treino, os animais foram novamente colocados na arena por um período de 10 min na presença de dois objetos idênticos.

[0336] O comportamento exploratório foi definido como o ato de cheirar ou tocar o objeto com o focinho ou as patas dianteiras e o tempo de exploração foi registrado. A sessão teste foi realizada com os animais colocados em contato com um objeto familiar e um objeto novo e, novamente, o tempo de exploração dos objetos foi registrado durante um período de 5 minutos. Os objetos eram feitos do mesmo material, possuíam a mesma textura, tamanhos similares, porém formas e cores distintas. Tanto a identidade do objeto novo quanto a sua posição na arena foram randomizadas. Os mesmos foram devidamente higienizados com etanol 10% entre uma sessão e outra, para evitar a influência de pistas olfatórias. Foram

da arena nas sessões treino e teste (cm); 3) tempo percentual de exploração do objeto familiar e do objeto novo na sessão teste.

[0337] Para garantir a formação da memória foi estabelecido como tempo de corte um mínimo de 10 s na exploração total dos objetos na sessão treino. No teste, considerou-se um tempo mínimo de 5 s de exploração. Todas as sessões foram filmadas. A distância total percorrida (cm) pelos animais no interior da arena foi determinada com o auxílio do programa MouseGlob (Castro & Castro).

[0338] As diferentes substâncias foram administradas por gavagem, no quarto dia de experimento, em solução salina (NaCl 0,9%) das substâncias LFQM-56 (100 $\mu\text{mol/kg}$ ou 37 mg/kg), LFQM-57 (100 $\mu\text{mol/kg}$ ou 38 mg/kg), LFQM-67 (100 $\mu\text{mol/kg}$ ou 36 mg/kg), LFQM-75 (100 $\mu\text{mol/kg}$ ou 42 mg/kg), LFQM-88 (100 $\mu\text{mol/kg}$ ou 38 mg/kg). Trinta minutos após, foi realizada a indução da amnésia colinérgica pela administração de escopolamina i.p. (0,99 $\mu\text{mol/kg}$), os grupos controle receberam salina pela mesma via. A sessão treino teve início 30 min após a administração do segundo tratamento (Figura 68).

[0339] Os dados experimentais do ensaio de reconhecimento de objeto novo estão mostrados na tabela 2, mostrando o tempo total de exploração dos objetos pelos animais nas sessões treino e teste. Podemos observar que não houve uma diferença significativa entre os diferentes grupos experimentais, descartando assim a influência deste parâmetro nos demais resultados.

[0340] **Tabela 2:** Efeito das substâncias LFQM-56, LFQM-57, LFQM-67, LFQM-75 e LFQM-88 (100 $\mu\text{mol/kg}$ v.o.) sobre o tempo total de exploração dos objetos nas sessões treino e teste (n = 05 - 19).

Tratamentos	Tempo Total de Exploração dos Objetos	
	Treino ^a	Teste ^b

LFQM57 + SAL	56,35 ±13,99	29,63 ± 8,04
LFQM67 + SAL	84,25 ±19,76	19,48 ± 8,49
LFQM75 + SAL	56,80 ±16,86	18,82 ±5,92
LFQM88 + SAL	69,17 ±10,46	38,88 ± 10,48
SAL + SCP	74,43 ±10,60	28,37 ± 4,36
LFQM56 + SCP	82,54 ±13,38	23,98 ± 3,79
LFQM57 + SCP	78,59 ±16,52	29,99 ± 7,14
LFQM67 + SCP	84,01 ± 17,04	30,88 ± 9,60
LFQM75 + SCP	81,91 ±23,13	20,56 ± 7,45
LFQM88 + SCP	64,56 ±10,15	37,40 ± 7,91

^aANOVA: $F_{(1,126)} = 0,854$; $P = 0,587$ ^bANOVA: $F_{(1,112)} = 1,140$; $P = 0,337$

[0341] Na figura 69A são apresentados os resultados do teste de reconhecimento de objeto para os animais tratados apenas com as substâncias-teste e salina. Podemos observar que o grupo controle (tratamento apenas com solução salina) reconhece o objeto familiar e, desta forma, passa significativamente mais tempo explorando o objeto novo (Teste t pareado: $t = 4,405$; $P < 0,001$). O tratamento com LFQM-67 não interfere na formação de memória, o que pode ser observado por um tempo significativamente maior de exploração do objeto novo (Teste t pareado: $t = 4,040$, $P = 0,007$). O tratamento com LFQM-75 e LFQM-88 também não afetam a memória dos animais, sendo apenas necessário o aumento do número de animais nestes grupos para que a significância possa ser demonstrada (Teste t pareado: $t = -1,258$; $P = 0,249$; $n = 08$ / $t = 2,221$; $P = 0,090$, $n = 05$; respectivamente). Já os animais tratados com LFQM-56 e LFQM-57 tiveram a memória de reconhecimento prejudicada pelas substâncias, o que pode ser evidenciado pela ausência de diferença no tempo de exploração entre o objeto familiar e novo (Teste t pareado: $t =$

amnésia induzida por escopolamina nos animais. Como esperado, o grupo de animais tratados apenas com escopolamina não mostra preferência pelos objetos, demonstrando que os animais não possuem memória do objeto familiar e, portanto, exploram os dois pelo mesmo período de tempo (Teste t pareado: $t = 1,435$; $P = 0,168$). LFQM-57 (Teste t pareado: $t = 0,128$; $P = 0,902$), LFQM-67 (Teste t pareado: $t = 0,064$; $P = 0,951$) e LFQM-88 (Teste t pareado: $t = 0,029$; $P = 0,978$) não foram capazes de reverter a amnésia colinérgica.

[0343] Anteriormente, havíamos encontrado um efeito de reversão da amnésia colinérgica com o uso da substância LFQM-56. Porém, com o aumento do número de animais tratados, a variabilidade dos dados resultou em perda da significância estatística anteriormente encontrada para este grupo experimental (Teste t pareado: $t = 1,843$; $P = 0,090$; $n = 13$) (**figura 2**). Este dado, associado ao efeito amnésico demonstrado para esta substância (**figura 1**) faz com que LFQM-56 não seja mais considerado um bom candidato para a continuação dos estudos farmacológicos.

[0344] Por outro lado, o tratamento com LFQM-75 que demonstrou a capacidade de reverter a amnésia colinérgica em nosso ensaio (Teste t pareado: $t = 3,471$; $P = 0,008$) (**figura 69**), sendo interessante continuar a explorar o seu perfil farmacológico em outros modelos de memória relevantes para a Doença de Alzheimer.

[0345] Além da exploração dos diferentes objetos pelos animais, durante a realização dos experimentos, também foi avaliada a locomoção espontânea dos mesmos. A **figura 70** mostra a distância total percorrida (em cm) pelos animais no interior da arena nas sessões treino e teste. Podemos observar que as substâncias teste não alteram a locomoção dos animais em nenhuma das sessões (nem no treino, nem no teste). Esses dados corroboram dados anteriormente relatados pelo grupo para LFQM-56 e

efeito já é relatado na literatura para este fármaco e pode estar relacionado ao bloqueio de receptores muscarínicos na região do estriado.

[0346] O efeito hiperlocomotor da escopolamina não é inibido pelo pré-tratamento com LFQM-56 e LFQM-88. Já LFQM-57 e LFQM-67 causam uma inibição parcial do efeito hiperlocomotor da escopolamina, por não haver diferença significativa no deslocamento comparado com o controle negativo (SAL+SAL) nem com o controle positivo (SAL + escopolamina). A substância LFQM-75 apresenta um perfil mais complexo, revertendo parcialmente a hiperlocomoção apenas na sessão treino, e não na sessão teste.

[0347] Como parte das orientações da última reunião de avaliação do INCT-INOVAR (2013) todos os experimentos deveriam, na medida do possível, utilizar o donepezil como referência, uma vez que a série-alvo foi inspirada estruturalmente em tal fármaco. Na tentativa de seleção da dose de donepezil, apesar de utilizar o fármaco de fornecedores distintos, foram encontradas várias dificuldades experimentais. Foram testadas três doses diferentes (2, 5 e 10 mg/kg v.o), e conhecendo-se o efeito hipolocomotor deste fármaco na dose de 20 mg/kg v.o. e, ainda, considerando a escassez de dados com a administração desta substância a camundongos por via oral, consideramos mudar a via de administração para i.p. (Figura 73).

[0348] 2.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

[0349] Toda a série-alvo das concretizações aqui reveladas foi submetida a uma triagem *in vivo* para avaliação da atividade anti-inflamatória periférica, utilizando-se o teste de aloíndia mecânica ou de pressão em pata de camundongos (Von Frey eletrônico).

[0350] Neste modelo experimental, a hipernocicepção é induzida pela injeção intraplantar de carragenina e a tensão medida pelo transdutor é registrada quando o animal retira a pata. A tensão aplicada na pata foi repetida até que se conseguissem duas medidas similares. Os camundongos foram colocados em uma caixa de acrílico (12x10x17 cm de altura) por 30 minutos antes do teste para que eles fossem ambientados. Durante esse

período de adaptação, as patas dos animais foram tocadas 2-3 vezes com a ponta do transdutor e, após esse período, a leitura basal foi realizada. Após uma hora dos tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina 100 pg/pata e registrou-se a sensibilidade nociceptiva de cada animal, depois de três horas da aplicação da carragenina (Figuras 74 e 75).

[0351] Este modelo experimental revelou as substâncias LFQM-56, LFQM-65, LFQM-66, LFQM-67, LFQM-68, LFQM-73, LFQM-74, LFQM-75, LFQM-76, LFQM-83 e LFQM-84 com o melhor perfil anti-inflamatório, sendo capazes de diminuir a intensidade de hipernocicepção dos camundongos de modo comparável ou melhor que a indometacina. As substâncias que apresentaram melhor perfil de atividade foram então submetidas ao ensaio de hiperalgesia induzida por formalina, visando avaliar as propriedades analgésicas associadas ao efeito anti-inflamatório.

[0352] Neste ensaio, os animais receberam a administração intraplantar de uma solução de formalina e exibem comportamento nociceptivo espontâneo reconhecido e quantificado pela observação da quantidade de lambidas na pata lesada. Este ensaio é caracterizado por duas fases distintas de avaliação: uma primeira fase, chamada neurogênica ou fase inicial, que compreende os primeiros 5 minutos e, está associada à excitação de nociceptores periféricos, antes de iniciada a resposta inflamatória. Numa segunda fase, durante 10-15 minutos, é avaliada a resposta de sensibilização central dos animais à sensação dolorosa, mediada por citocinas e quimiocinas oriundas do processo inflamatório tecidual, sendo, portanto, a fase que melhor representa a avaliação anti-inflamatória de substâncias de interesse.

[0353] Os resultados do ensaio de formalina, na dose única de 100 $\mu\text{mol/kg}$ por substância-teste, indicaram que as substâncias LFQM-54, LFQM-56, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-73, LFQM-75, LFQM-76 e LFQM-84 apresentaram na primeira fase, atividade antinociceptiva significativa comparada ao veículo. Na fase inflamatória, as substâncias LFQM-54, LFQM-

55, LFQM-56, LFQM-65, LFQM-67, LFQM-73, LFQM-74 e LFQM-76 apresentaram atividade anti-inflamatória significativa (Figura 77).

[0354] Inicialmente, uma análise comparativa dos resultados obtidos da avaliação anticolinesterásica *in vitro* e anti-inflamatória levou a evidências de que as substâncias LFQM-65 e LFQM-67 poderiam ser potentes candidatas a protótipos de fármacos de ação dupla enquanto que as substâncias LFQM-73 e LFQM-74 parecem ser promissoras como candidatas a protótipos de fármacos anti-inflamatórios. Dessa forma, essas 5 substâncias foram selecionadas para ensaios mais aprofundados de avaliação anti-inflamatória.

[0355] Como consequência dos primeiros resultados obtidos, as substâncias mais ativas nos ensaios de Von Frey e formalina foram submetidas ao teste de edema de pata induzido por carragenina, do qual foram obtidos os dados de potência anti-inflamatória (ID₅₀).

[0356] Neste experimento, foi feita a administração intraplantar de carragenina em uma das patas dos camundongos, provocando uma reação inflamatória reprodutível. O processo inflamatório induzido por carragenina se instala imediatamente após sua administração, resultante da ação combinada da liberação de prostaglandinas, bradicinina, histamina, taquicinas e espécies reativas de oxigênio. Nesta condição, os neutrófilos facilmente migram para os locais de inflamação e a resposta inflamatória é quantificada pelo aumento no tamanho da pata (edema) dos animais que é modulado por inibidores de moléculas específicas dentro da cascata inflamatória.

[0357] A medida do volume da pata do animal foi realizada após três horas da administração de carragenina, utilizando pletismógrafo, e o edema foi calculado pela diferença entre o volume final (após carragenina) e o volume inicial (sem carragenina). Os dados obtidos neste ensaio demonstraram que as substâncias-teste foram capazes de reduzir significativamente o edema induzido por carragenina e que, de forma geral, as substâncias atuaram de modo comparável ao observado no grupo tratado com indometacina (Figura 78).

[0358] Os resultados obtidos neste ensaio, com medidas do volume da pata evidenciaram que as substâncias-teste foram capazes de reduzir significativamente o edema induzido por carragenina. De forma geral, as substâncias atuaram de modo comparável ao observado no grupo tratado com indometacina. A curva dose resposta para determinação da ID50 foi obtida deste mesmo experimento, por administração das moléculas-teste e da indometacina, como fármaco padrão, nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 pmol/Kg (Figura 79) na 3ª hora (180 minutos) após a administração da carragenina.

[0359] Os resultados obtidos neste ensaio evidenciaram que as substâncias-teste foram capazes de inibir 50% do edema em concentrações que variam de 2,67 µM para LFQM-74 que foi o derivado mais potente da série a 68,3 pM para LFQM-65, o menos potente. Porém, os resultados mais recentes da avaliação colinérgica *in vivo*, revelaram que LFQM-75 parece ser o melhor candidato a molécula-líder da série, a despeito de seu perfil anti-inflamatório ser inferior a outras substâncias da série. Este dado revelou a necessidade de determinação de sua DE50 em modelos de inflamação o que está sendo providenciado.

[0360] 2.2.4 Avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatória

[0361] Sabe-se que a inflamação é a consequência da resposta do organismo a danos físicos, infecções ou estimulação antigênica, no qual ocorre, geralmente, acúmulo local de fluido, proteínas plasmáticas e células do sistema imune. Apesar de complexa, a resposta inflamatória é desencadeada, principalmente, pela ação de citocinas pró- inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 e interleucina-1 β . O macrófago é a principal célula responsável pela síntese destas citocinas em muitos tecidos, o que ocorre após o reconhecimento de substâncias imunogênicas por receptores intra ou extracelulares. Muitos tipos de substâncias endógenas ou oriundas de micro-organismos podem ativar estes receptores, conhecidos como receptor de reconhecimento de padrões,

desencadeando a ativação de um série de cascatas intracelulares, que fatalmente levam a ativação de fatores de transcrição. Quando ativados os fatores de transcrição translocam para o núcleo e se ligam a pontos específicos do DNA, permitindo a expressão de genes associados ao processo inflamatório. Dentre os fatores de transcrição mais envolvidos na indução da expressão de genes associados ao processo inflamatório, podemos destacar o fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB). O NF-kB pode ser formado por homo ou heterodímeros, de uma família de 5 membros: c-Rel (REL), RelA/p65 (RELA), RelB (RELB), p50/p105 (NFKB1) e p52/p100 (NFKB2). O mais prevalente na maioria das células, assim como em macrófagos, é o heterodímero p65-p50 que, homeostaticamente, é inibido, sobretudo, pela interação de molécula inibitória kB-a (IκB-a) com a subunidade p65. Com a degradação da molécula inibitória, o NF-kB entra no núcleo e promove a expressão de vários genes, incluindo as citocinas pró-inflamatórias, ciclooxigenase e selectinas.

[0362] Como previamente demonstrado, os compostos LFQM-56, LFQM-57, LFQM-65 e LFQM-67 demonstraram atividade anti-inflamatória em modelos *in vivo* de inflamação induzida por carragenina. Visto a importância do NF-kB na indução e manutenção do processo inflamatório, o efeito dos compostos sobre a ativação do NF-kB foi investigado em macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

[0363] Para estes experimentos foram utilizados macrófagos RAW 264.7 estavelmente transfectadas com o gene NF-KB-pLUC, para expressarem luciferase especificamente através do fator de transcrição NF-kB, como descrito por Cooper et al. (2010). Os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços ($3 \cdot 10^5$ células/poço), encubadas em estufa a 37° C, a tensão constante de 5% de CO₂, *overnight*. Antes da realização do experimento, os sobrenadantes foram substituídos, e as células foram pré-tratadas com concentrações de 0,1-100 pM para cada uma das substâncias-teste: LFQM-56, LFQM-57, LFQM-65 e LFQM-67. Após 30 minutos, foi

adicionado o lipopolissacarídeo (LPS; 1 pg/mL) para indução da ativação do NF-kB. Após 4 horas de incubação, os sobrenadantes foram removidos e as células foram lisadas, sendo uma alíquota (10 pL) retirada de cada poço e transferida para placa branca opaca junto a 25 pL de luciferina, reagente para ensaio de luciferase. A quantificação da luminescência gerada pela oxidação da luciferina, catalisada pela luciferase, foi realizada no *FlexStation 3 Microplate Reader* (Molecular Devices), com tempo de integração de 1000 ps.

[0364] Na tentativa de se identificar o mecanismo molecular pelo as substâncias-alvo reduzem a resposta inflamatória, foram utilizados macrófagos RAW 264.7-Luc, geneticamente modificados para expressar a enzima luciferase como indicador da atividade de NF-kB. Como o observado na Figura 80, o LPS induz o aumento das unidades de luminescência (o que pode ser interpretado como atividade do NF-kB), porém nenhum dos compostos analisados mostrou-se capaz de inibir este efeito.

[0365] Diante destes resultados, conclui-se que, apesar dos compostos LFQM-56, LFQM-57, LFQM-65 e LFQM-67 apresentarem atividade anti-inflamatória em modelo experimental de inflamação induzida por carragenina, como previamente descrito, eles não regulam negativamente a ativação de NF-kB mediada por TLR4 *in vitro*.

[0366] No momento estamos iniciando ensaios específicos para avaliação do efeito destas substâncias sobre a COX-1, COX-2 e 5-LOX visando tentar elucidar o mecanismo de ação anti-inflamatório.

[0367] 2.2.5 Avaliação do mecanismo de ação anti-neuroinflamatória e neuroprotetora utilizando modelo *in vivo* de malária cerebral

[0368] A malária cerebral é a principal complicação da infecção pelo *Plasmodium falciparum*. A fisiopatologia da doença está associada à adesão de hemácias parasitadas ao endotélio cerebral, levando a sua ativação. Como consequência, eventos celulares (como ativação e migração de leucócitos para o local, produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1p, INF- γ , IL-6, IL-12 bem como quimiocinas como MCP-1, RANTES, IL-8) e

vasculares (aumento de expressão de moléculas de adesão e na permeabilidade vascular) são deflagrados. Como consequência da ativação da resposta imune, além da produção de citocinas, célula fagocíticas produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/NOS) para o controle da infecção. Porém, o desequilíbrio desta resposta pode levar a obstrução do vaso sanguíneo, hipóxia e hemorragia, característicos da malária cerebral. Concomitante a este fato, as células da glia são ativadas, corroborando com produção de citocinas pró-inflamatórias e ROS/NOS, gerando um processo neuro-inflamatório análogo a muitas doenças neurodegenerativas com a doença de Alzheimer.

[0369] O desequilíbrio na fisiologia cerebral, isto é, diminuição da receptação de glutamato e produção de ácido quinolínico, levam ao fenômeno de excitotoxicidade neuronal, via superativação de receptores NMDA, o que pode levar a morte neuronal.

[0370] Em modelos experimentais da doença (infecção de camundongos C57BL/6 com *Plasmodium berghei* ANKA) o estresse oxidativo pode ser considerado um marcador de disfunção cerebral associada à malária cerebral, podendo ser avaliado pela Peroxidação de lipídeos (como a formação de subprodutos como o malondialdeído), proteínas ou DNA. De forma a não exacerbar a produção de ROS, que é danoso também para células e tecidos, o organismo lança mão do sistema de glutathionas que são capazes de detoxificar radicais livres. Todavia, quando estes últimos estão em excesso, ocorre o consumo do sistema, que experimentalmente, pode ser detectado em reação colorimétrica pelo uso do reagente de Ellman (DTNB). Além disso, a ativação de granulócitos tem como marcador a enzima mieloperoxidase, presente nos grânulos de neutrófilos.

[0371] Desta forma, o uso de técnicas capazes de detectar a presença de estresse oxidativo bem como da atividade enzimática da mieloperoxidase podem ser utilizada como marcadores de neuro-inflamação no modelo de malária murina.

[0372] Neste presente trabalho, podemos observar que a substância LFQM-67 apresentou uma forte tendência a reduzir os níveis de malondialdeído, porém com consumo de tióis, e de mieloperoxidase, sugerindo um possível efeito anti-inflamatório e neuroprotetor.

[0373] Análises bioquímicas do tecido cerebral

[0374] Camundongos C57BL/6 machos com 6-8 semanas de idade (CEUA-L033/09) foram inoculados intraperitonealmente com 0.2 mL de uma suspensão de 10^6 hemácias infectadas com parasita da malária *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). O grupo controle foi inoculado com hemácias não infectadas. A formação de malondialdeído (MDA) foi realizada pela reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), pela adição ao homogenato de cérebro do mesmo volume de ácido tiobarbitúrico a 0,67%. As amostras foram então levadas a aquecimento a 96°C, por 30 min. A quantidade de malondialdeído (MDA) foi determinada pela absorvância a 535 nm.

[0375] Avaliação dos níveis de tióis totais foi realizada no homogenato, que foi transferido para a solução 10% TCA. Após centrifugação 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, foi adicionado um igual volume do sobrenadante de uma solução de TRIS-HCl (0,4 M) contendo 20 mM de ácido 5,5'-dinitrobenzóico (DTNB). A amostra foi lida a 412 nm.

[0376] Avaliação dos níveis de mieloperoxidase foi feita no tecido cerebral homogeneizado com 500 µL de tampão PBS-HTAB, posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente a 1200 rpm por 15 min. 50 µL de solução de homogeneização foram então adicionados a 50 do sobrenadante e 50 de o-dionisidina (duplicata), incubado a 37°C na leitora de placa por 15 min e foi adicionado 50 µL de solução de peróxido de hidrogênio (0,006%). O material foi incubado por mais 10 min a 37°C analisado em leitor de microplaca a 460 nm.

[0377] Foram avaliadas nesta concretização as substâncias LFQM-56, LFQM-57 e LFQM- 67, nas doses de 1, 5 e 10 µM, com tratamento realizado

entre os dias 3 e 6 após a infecção por via oral.

[0378] A análise dos resultados não revelou diferenças significativas em relação ao nível de lipídeos peroxidados (MDA - Figura 82), ou quantidade de tióis livres (Figura 83) entre os animais infectados. O mesmo foi observado para análise de MPO (marcador de infiltração neutrofílica - Figura 84), porém a ausência de diferença estatística pode estar associada ao n experimental (n= 5/ grupo), sendo necessário repetir os experimentos.

[0379] As substâncias LFQM-56 e LFQM-67 se mostraram as mais promissoras, pois tendem tanto a diminuir os níveis de MDA (mas com consumo de tiol), quanto da mieloperoxidase.

[0380] 2.2.6 Avaliação da atividade antiamilóide *in vivo*

[0381] Este modelo animal foi realizado sob condições semelhantes ao descrito para o modelo de reversão de amnésia induzida por escopolamina quanto ao tratamento e ambientação dos animais. A proteína Abeta foi dissolvida conforme especificação do fabricante em uma concentração de 6mg/mL em água deionizada. Posteriormente, esta foi dissolvida em PBS estéril a uma concentração de 3mg/mL e colocada por 48h em estufa a 37°C para a ativação da proteína. No dia do experimento, a proteína já ativada foi dissolvida novamente em PBS estéril para a concentração de 400pmol.

[0382] Trinta minutos antes do procedimento de estereotaxia (cirurgia para a injeção intra-hipocampal da proteína Beta amiloide ou PBS). Os animais receberam uma única injeção intra-peritoneal dos compostos testados, sendo que 10 minutos antes do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados (ketamina/xylasina). Uma vez anestesiados os animais foram submetidos à tricotomia, para a retirada do pelo no entorno do campo cirúrgico. Os animais foram fixados através do ducto auditivo no estereotático (Insight). Uma incisão foi feita para a exposição do crânio. Sendo feita a assepsia do local com álcool 70% e iodo. Com auxílio das coordenadas obtidas do atlas Paxino e Franklin 2007, foi identificada a região CA1 do hipocampo e com o auxílio de uma broca foi realizada a perfuração da calota

craniana e posterior inserção da agulha na posição correta para a injeção da proteína Abeta ou PBS (coordenadas a partir do bregma). Após a injeção de 500 nL da Abeta ou PBS o local da cirurgia foi suturado e os animais voltaram para suas caixas onde permaneceram em aquecimento artificial até o final do efeito anestésico. Para evitar desidratação, os animais receberam um suporte de soro fisiológico.

[0383] Procedimento comportamental: Cinco dias após a cirurgia, a habituação dos animais foi feita por exposição durante 5 minutos à caixa teste, sem a presença dos objetos de teste. Esta é a chamada habituação para anular o efeito de novidade da caixa. Após a exposição, os animais retornaram às suas caixas.

[0384] Pré-Teste: No sexto dia, os animais foram novamente expostos à caixa por 10 minutos; porém, desta vez na presença de dois objetos exatamente iguais. Após a exposição, os animais retornaram às suas caixas. Este é o chamado pré-teste onde os animais têm contato com os objetos e adquirem a memória dos objetos que no 7º dia (teste) serão antigos e não representarão novidade em condições comportamentais em que o processo mnemônico esteja intacto.

[0385] Teste: 24 horas após o pré-teste, os animais são novamente expostos à caixa. Entretanto desta vez um dos objetos antigos (expostos aos animais no pré-teste) foi substituído por um objeto completamente novo para o animal. Este procedimento avalia a memória de longo prazo dos animais muito relacionada com a função hipocampal, local da injeção da proteína Abeta. Os animais são deixados na caixa por 5 minutos para interagir com os a objetos (novo e antigo) (Figura 86).

[0386] O índice de reconhecimento é calculado pela seguinte fórmula:
(Tempo de interação com o objeto novo) / (Tempo de interação com o objeto novo + Tempo de interação com o objeto velho) * 100

[0387] Animais com déficits mnemônicos possuem índice de reconhecimento inferior a 65%.

[0388] Como pode ser visto na Figura 87, ambas as substâncias LFQM-56 e LFQM-67 foram capazes de reverter significativamente a amnésia induzida pela administração de Ap, uma vez que o tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto antigo foi bastante superior ao grupo controle.

[0389] O experimento controle serviu para demonstrar que a preferência pelos objetos não reflete um comprometimento motor, ou seja, o animal é capaz de se locomover e interagir com o objeto novo. Os animais que receberam a proteína PA intra-hipocampal, não lembram que já haviam interagido com o objeto anteriormente.

[0390] Nas Figuras 88 e 89 são mostrados os dados da avaliação no mesmo modelo das substâncias LFQM-88 (nas doses de 50 e 100 pM), LFQM-75 (100 pM) e LFQM- 57 (100 pM). Novamente, todas demonstraram o mesmo perfil antiamiloide observado anteriormente para LFQM-56 e LFQM-67, aparentemente sem comprometimento do padrão locomotor.

[0391] O conjunto de resultados obtidos neste ensaio, sugerem que a injeção prévia dos compostos, previnem os déficits mnemônicos de longo prazo promovidos pela injeção intra-hipocampal da proteína β A.

[0392] Como comentado anteriormente, todos os experimentos deveriam utilizar o donepezil como referência. Portanto, os experimentos de avaliação das substâncias-alvo sobre o déficit mnemônico foi feito, para comparação com o donepezil, fármaco de referência no tratamento atual da DA e utilizado como modelo estrutural no planejamento das moléculas em estudo. Na Figura 85 são mostrados os resultados preliminares desta avaliação, onde as substâncias LFQM-56 e LFQM-67 foram testadas nas doses de 25, 50, 100 e 200 μ M, em comparação ao donepezil (5 mg/Kg).

[0393] Importante salientar que neste novo protocolo, foram encontradas muitas dificuldades experimentais, com carência dos animais necessários (espécie e quantidade), mas principalmente a alta taxa de mortalidade observada: Donepezil (60%), LFQM-56 (200uM, 60%), LFQM-56 (100uM,

45%), LFQM-56 (50uM, 20%), LFQM-67 (200uM, 70%), LFQM-67 (100 uM, 50%), LFQM-67 (50uM, 27%). Este contratempo atrasou sobremaneira a condução os experimentos. A hipótese mais provável para mortalidade elevada parece ser o aumento da biodisponibilidade do donepezil e das substâncias-teste por v.o., com um consequente sinergismo com o anestésico, fazendo com que os animais não sobrevivessem à cirurgia, efeito este não observado nos experimentos cuja administração foi i.p.

[0394] Como forma de solucionar este obstáculo experimental, o protocolo foi modificado, com a administração das substâncias-teste por v.o. 1 dia após a cirurgia de injeção da proteína PA. Os experimentos seguindo este novo protocolo estão em andamento.

[0395] Na Figura 85 são mostrados os resultados obtidos com os animais que sobreviveram à cirurgia estereotóxica, seguindo o protocolo inicial, com administração das substâncias-teste antes do procedimento cirúrgico.

[0396] Como pode ser observado, mesmo nas doses menores, novamente as substâncias lfqm-56 e lfqm-67 mostraram-se capazes de reverter o déficit mnemônico induzido pela proteína PA, de modo análogo ao observado para o fármaco donepezil.

[0397] Como meta adicional à reavaliação de todas as substâncias-líder da série utilizando o novo protocolo proposto, serão realizados estudos imunohistoquímicos para tentar-se identificar o mecanismo de ação anti-amiloide observado.

[0398] 2.2.7 Avaliação da atividade locomotora em modelo de campo aberto e rota rod.

[0399] Visando avaliar o efeito das substâncias-teste na função motora e no comportamento dos animais submetidos a um ambiente restrito, possivelmente indicando um efeito central e adverso, as substâncias-líder da série foram submetidas à avaliação no ensaio de campo aberto. Neste experimento, após 1 hora do tratamento oral com as substâncias-teste na dose de 100 pM, cada camundongo foi colocado individualmente em uma arena

circular de acrílico dividido em quadrantes, dos quais 8 junto às paredes do aparato foram considerados periferia e os 4 demais, os centrais. Cada camundongo foi colocado no centro da arena e filmado por 5 minutos para posterior análise. Foi registrado o número de cruzamentos com as quatro patas no centro, na periferia, o número total de entradas e o número de “rearings” (exploração vertical). Os resultados são apresentados na figura 86 e revelaram claramente que nenhuma das substâncias alterou o comportamento ou a locomoção dos animais na dose de teste, corroborando os resultados obtidos anteriormente no modelo de amnésia colinérgica induzida por escopolamina e no modelo de déficit mnemônico induzido por PA.

[0400] Avaliação da citotoxicidade e Genotoxicidade

[0401] A citotoxicidade foi avaliada pela viabilidade celular no teste de MTT que é um teste usado para avaliar a viabilidade celular, de execução rápida e objetiva, baseado em uma reação colorimétrica. O sal MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) entra na mitocôndria da célula viável e é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais formazan, de coloração azul escuro. A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular.

[0402] A suspensão celular de monócitos normais, obtidos de sangue humano, na concentração de $2,4 \times 10^6$ células/mL foi distribuída em uma placa de 96 poços, 90 pL por poço, e incubadas a 37 °C em incubadora a 5% de CO₂, juntamente com mais 10 pL da amostra teste. Neste estudo foram utilizadas diferentes concentrações (100; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,48; 0,24; 0,06 pg/mL) dos compostos testados e placa foi incubada por 48 h.

[0403] Após o período de incubação adicionou-se mais 10 pL do corante MTT (5 mg/mL) e as células foram novamente incubadas por mais 4 h. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionaram-se 100 pL de DMSO para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorvância correspondente a cada amostra foi medida

no leitor de ELISA a 560 nm. A absorbância obtida das células controle, não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular.

[0404] Os dados foram avaliados utilizando regressão linear para se obter os valores de CC50 e CC90 (concentração citotóxica para 50% e 90% das células, respectivamente).

[0405] Na tabela 4 são apresentados os dados obtidos no ensaio de viabilidade celular, que indicou que as substâncias mais ativas da série, aparentemente, são pouco citotóxicas. A substância LFQM-56 é a mais citotóxica com uma CC50 (concentração citotóxica para 50% das células) de 197,4 pmol/L. Porém, vale ressaltar que a IC50 da LFQM-56 para a inibição da AChE é de 25,9 pM ou seja, aproximadamente 8 vezes menor que sua dose citotóxica.

[0406] Tabela 4: Dados da avaliação de citotoxicidade frente a monócitos de sangue humano para as substâncias LFQM-56, LFQM-57, LFQM-67, LFQM-73, LFQM-75, LFQM-88

Substância	CC50 (µg/mL)	CC90 (µg/mL)
LFQM56	73,41	166,82
LFQM57	180,07	388,84
LFQM67	181,70	371,94
LFQM73	281,00	568,03
LFQM75	250,93	507,21
LFQM88	95,99	190,78

[0407] A genotoxicidade foi avaliada pelo Ensaio de Micronúcleo com bloqueio de citocinese usando células derivadas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Esse modelo tem sido amplamente estudado para avaliar a atividade genotóxica de diferentes compostos incluindo os protótipos a fármacos. As células da linhagem HepG2 mantêm a atividade das enzimas relacionadas à biotransformação, as quais desempenham importante papel na ativação de carcinógenos e de agentes genotóxicos.

[0408] Os micronúcleos (MNs) surgem ao término do processo de divisão celular e são constituídos por fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastrogênico) ou por cromossomos inteiros (efeito aneugênico) que

foram excluídos do núcleo principal devido, respectivamente, a quebras cromossômicas ou alterações no aparelho mitótico. Assim sendo, o teste de micronúcleo representa uma das abordagens metodológicas comumente empregadas nos estudos de genotoxicidade.

[0409] As células HepG2 foram semeadas em placas de 12 poços (inoculo de 2×10^5 células/mL) contendo meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM/F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24h, as culturas foram tratadas com os diferentes compostos na concentração de 50 pM por 3h. Ao término do tratamento, as culturas foram lavadas com PBSA e tratadas por mais 26h com citocalasina (3 pg/mL), um inibidor de polimerização dos filamentos de actina, que determina o bloqueio da citocinese. Dessa forma, as células que estão em intensa atividade proliferativa concluem a divisão nuclear, mas não concluem a divisão do citoplasma. Esse método permite o enriquecimento de células binucleadas na cultura, as quais são utilizadas para a determinação na frequência de MNs. As células foram coletadas por digestão enzimática (tripsina/EDTA), centrifugadas a 800 rpm, imersas em solução hipotônica (1% de citrato de sódio a 4°C) e fixadas em metanol/ácido acético (3:1). As preparações citológicas foram feitas utilizando-se lâminas previamente limpas, as quais ficaram imersas em água destilada a 4 °C. Após secas, as lâminas foram coradas com Giemsa (1:20 em tampão fosfato) por 10 minutos. A análise foi realizada em microscópio de luz (aumento 400x) e os dados apresentados representam a média de 3 amostras por tratamento.

[0410] Considerando que danos causados ao DNA por exposição a agentes mutagênicos são expressos em Micronúcleos (MNs) após um ciclo de divisão celular, é importante determinar o Índice de divisão nuclear (IDN), antes de analisar a frequência de MNs, para detectar se as condições experimentais testadas não afetam a taxa de proliferação da linhagem HepG2. O cálculo do IDN foi realizado segundo a equação: $IDN = (M1 + 2.M2 + 3.M3 + 4.M4)/N$, onde M1-M4 representam as populações celulares com

um, dois, três ou quatro núcleos e N representa o número total de células contadas por amostra. Para a determinação do índice de divisão nuclear (IDN) 500 células foram contadas por amostra e para a determinação na frequência de micronúcleos 1000 células binucleadas foram contadas por amostra, cujos critérios para a identificação de células binucleadas e micronúcleos foram descritos por Fenech (2000).

[0411] Os resultados mostraram que os compostos testados (LFQM-56, LFQM-57, LFQM-67, LFQM-75 e LFQM-88) exercem atividade citostática sobre células HepG2 quando utilizados na concentração de 50 pM por 3h (Figura 87).

[0412] Diante dos resultados obtidos, uma nova série experimental foi realizada de modo que a concentração testada foi reduzida para 20 pM. A determinação do IDN mostrou que nesta concentração nenhum dos compostos exerceu atividade citostática significativa (Figura 88). Dessa forma, a frequência de MNs foi determinada, segundo os critérios estabelecidos por Fenech (2000). A figura 89 mostra os resultados relacionados à determinação do potencial genotóxico dos compostos testados, considerando a frequência de MNs em células binucleadas. Os compostos LFQM-57, LFQM-67 e LFQM-75 induziram aumento significativo ($p < 0.05$) na frequência de micronúcleos indicando que os referidos compostos apresentam atividade genotóxica sobre a linhagem HepG2 quando utilizados na concentração de 20 pM. Novas séries experimentais estão em andamento para avaliar se esse resultado se mantém quando as culturas são tratadas com 10 pM e 5 pM.

[0413] Em paralelo ao teste de micronúcleo estão sendo realizados ensaios para verificar o potencial dos compostos em induzir quebras (fita simples e dupla) na molécula de DNA. Essa abordagem está sendo investigada por meio do ensaio de cometa que permite identificar quebras na molécula de DNA em células isoladas. Em conjunto, os dados obtidos no teste de micronúcleo e no ensaio do cometa permitirão alcançar resultados

conclusivos quanto à atividade genotóxica dos compostos testados.

[0414] 3. Estimativas *in silico* de parâmetros químicos, físico-químicos e ADME

[0415] Os parâmetros ADME, além de alguns dados químicos e físico-químicos foram previstos *in silico*, utilizando o Programa QikProp v. 3.5, desenvolvido pela Empresa Schrodinger.

[0416] Os dados mais relevantes são apresentados na tabela 3 e indicam que as substâncias-líder estão perfeitamente dentro dos parâmetros de referência que o programa gera, segundo o fabricante, a partir de 95% dos fármacos disponíveis aprovados. Além de parâmetros ADME, são apresentados ainda valores de volume molecular, previsão de sítios de metabolização, solubilidade em água (log S) e da qualidade de absorção humana.

[0417] Considerando este estudo, em comparação com os dados experimentais obtidos, percebe-se uma convergência entre, por exemplo, as substâncias que tiveram atividade dupla e os parâmetros previstos para atividade no sistema nervoso central; resultado semelhante foi observado para, aquelas cuja previsão indicou fraca ou ausência de atividade no SNC e que, de fato, demonstraram um melhor perfil anti-inflamatório.

[0418] Tabela 3. Estimativas *in silico* de parâmetros químicos, físico-químicos e ADME das substâncias-líder da série-alvo e do donepezil

	Substâncias								
	LFQM-56	LFQM-57	LFQM-67	LFQM-73	LFQM-74	LFQM-75	LFQM-88	dpz	
Perfil de atividade**	AD ^a	IACHe _b	AD	AI ^c	AI	IACHe	IACHe	IACHe	
Descritor/parâmetro ADME									VR*
Massa molecular	371,866	384,434	355,411	394,472	422,526	420,553	383,507	379,498	130-725

Metabólitos primários ou grupos funcionais reativos	Desalq. amina; ROH 2° → RCOR; H-benzílico → ROH	Desalq. amina; ROH 2° → RCO R; H-benzílico → ROH; lig. simples het-het átomo	Desalq. amina; ROH 2° → RCOR; H-benzílico → ROH	Desalq. amina; H-benzílico → ROH; NH tipo anilina → NOH ou NCOR; éster esteríc. acessível	Desalq. de amina; ROH 2° → RCO R; H-benzílico → ROH; a-hidroxilação éter cíclico	Desalq. de amina; ROH 2° → RCOR; H-benzílico tipo benzílico ^A ROH	Desalq. amina; ROH 2° → RCOR; H-benzílico → ROH	H-benzílico → ROH; a,P-desidrogenação na C=O; Desalq amina e éter;	
Volume molecular	1210,396	1245,471	1182,380	1315,137	1392,181	1429,326	1284,767	1266,695	500 2000
Log P oct/H ₂ O	3,330	1,785	3,076	2,559	3,043	3,939	3,451	4,368	-2,0-6,5
Log S (solub. H ₂ O)	-4,636	-3,559	-4,272	-4,543	-4,767	-5,730	-4,846	-4,477	-6,5-0,5
Log K HSA (albumina)	0,350	0,017	0,280	0,314	0,313	0,726	0,403	0,569	-1,5-1,5
Log BB (cérebro/sangue)	-0,641	-2,152	-0,685	-1,784	-0,867	-0,914	-0,810	0,189	-3,0-1,2
Atividade SNC (de -- a ++)	+	--	+	--	+/-	+/-	+/-	+	
Bloqueio canais HERG K ⁺ (log IC ₅₀)	-7,055	-7,004	-7,023	-7,214	-7,069	-7,157	-7,139	-6,608	< -5 (ruim)
% absorção oral humana	86	59	84	68	84	89	87	100	<25% baixa
Qualidade absorção oral	alta	média	alta	Média	Alta	alta	alta	alta	>80% alta

*VR = intervalo ou valor recomendado para 95% dos fármacos conhecidos (fonte: QikProp 3.2 Manual User - Schrodinger Software)

**definido após avaliação farmacológica *in vitro* e *in vivo* da série-alvo ^aAD= atividade dupla: inibitória de AChE e anti-inflamatória ^bIACHe = atividade inibitória de AChE ^cAI = atividade anti-inflamatória

[0419] Os valores de clog P, capacidade de ligação à albumina sérica, absorção humana foram adequados quanto aos valores de referência e em comparação com o donepezil, e são preditivos importantes para antecipar parâmetros de biodisponibilidade. Esclarecemos ainda que as substâncias LFQM-75 e LFQM-88 são membros da série-alvo original, mas inicialmente foram observadas somente atividade anti-colinesterásica relevante e estão

sendo tratadas com interesse meramente acadêmico, fora do escopo do INCT-INOVAR. Todavia, o conjunto de dados mais completos disponíveis no momento revelou que LFQM-75 pode ser um importante candidato a fármaco multi-alvo, o que ficou evidenciado nos modelos *in vivo* de avaliação colinérgica e de déficit mnemônico. O único dado preocupante parece ser relativo a um possível bloqueio de canais de hERG K^+ , o que seria um indicativo de toxicidade cardíaca, merecendo, portanto, confirmação experimental.

[0420] 4. Conclusões e perspectivas

[0421] Os resultados obtidos no desenvolvimento do projeto levaram à seleção de 5 substâncias com perfil de atividade dupla ou anti-inflamatória, ambas de interesse farmacêutico. Em decorrência das últimas avaliações, foram delineadas várias etapas adicionais para avaliação farmacológica que incluíram a avaliação *in vivo* nos modelos de formalina, edema de pata para determinação das propriedades e da potência anti-inflamatórias. Além disso, as substâncias também foram avaliadas no modelo de campo aberto, revelando que nenhuma apresenta efeitos de sedação, alteração comportamental e na locomoção dos animais. Alguns parâmetros ADME foram avaliados computacionalmente, indicando que as substâncias devem apresentar biodisponibilidade adequada.

[0422] Do conjunto de dados obtidos, são propostos 3 grupos de substâncias com perfis de atividade distintos. As substâncias LFQM-57, LFQM-75 e LFQM-88 foram as mais potentes inibidoras seletivas da AChE, inibindo a 100 μM cerca de 91,7%, 81,8% e 81,3% da atividade enzimática, com $\text{IC}_{50} = 2.71$, 10.89 e 10.39 μM , respectivamente, sem, contudo apresentarem atividades anti-inflamatórias significativas. As substâncias LFQM-73 (ID_{50} edema = 4.20 $\mu\text{mol/kg}$) e LFQM-74 (ID_{50} edema = 2.67 $\mu\text{mol/kg}$) apresentaram os melhores perfis de atividade anti-inflamatória, porém, não apresentaram atividade anticolinesterásica. Já as substâncias LFQM-56 (IC_{50} AChE = 25.39 μM ; ID_{50} edema = 8.76 $\mu\text{mol/kg}$) e LFQM-67

(IC₅₀ AChE = 8.65 μ M; ID₅₀ edema = 4.66 μ mol/kg) demonstraram os melhores perfis de ação dupla da série.

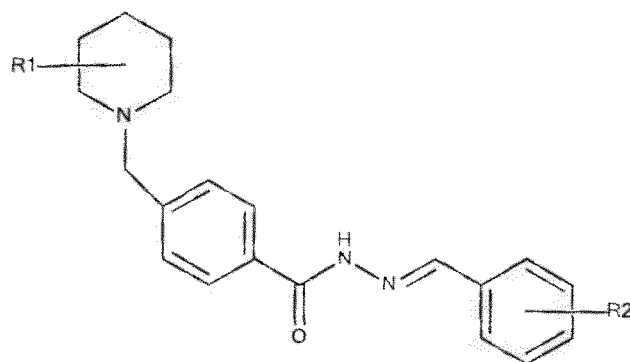
[0423] Os resultados mais recentes revelaram que as substâncias mais promissoras com perfil de ação múltiplo são LFQM-67 e LFQM-75, capazes de exercer efeitos significativos em modelos *in vivo* de reversão de amnésia induzida por escopolamina e de déficit mnemônico induzido pela proteína PA, além de efeito neuroprotetor, evidenciado no modelo de malária cerebral. Por outro lado, as substâncias LFQM-73 e LFQM-74, que demonstraram perfis de ação anti-inflamatórios relevantes, continuam a ser estudados para elucidação do mecanismo de ação. Nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade, aparentemente, estas substâncias-líder em cada perfil são pouco tóxicas, porém ensaios adicionais estão em andamento para conclusão sobre a efetiva toxicidade *in vitro* e indicar a necessidade de avaliação de embriotoxicidade.

[0424] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

COMPOSTO, PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPOSTO, USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OU DE DOENÇA NEURODEGENERATIVA, FORMA DE DOSAGEM ORAL E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

1. Composto **caracterizado** por ser representado pela fórmula I:



I

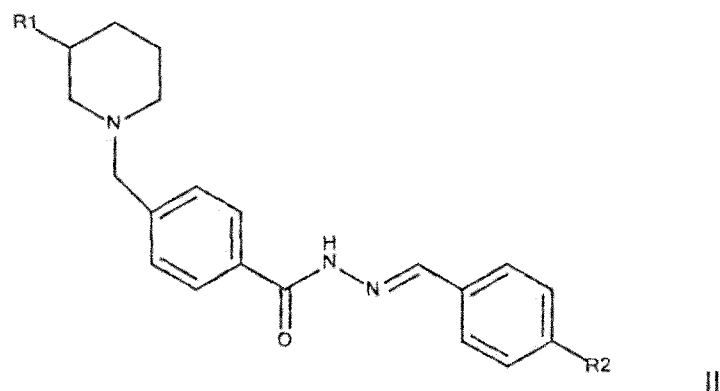
em que

R1 é escolhido do grupo que consiste de: OH, CH₃CHOO, oxialquila, oxiarila e carbamoila; e

R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolinil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc, triazolila, aminoalquila, aminoarila, O-alquila, arila, carbamoila, NHCO-alquila, e NHCO-arila.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** por R1 ser escolhido do grupo que consiste de: OH e CH₃CHOO; e R2 ser escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolil, 4-piperidinil, imidazol, SMe e OAc.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** por ser representado pela fórmula II:



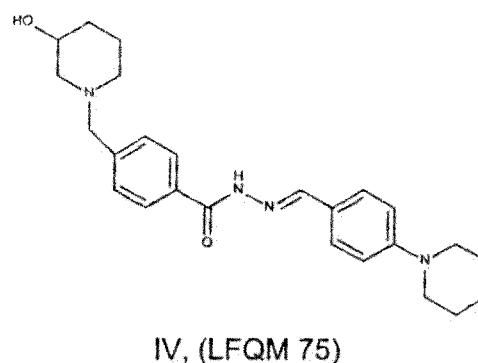
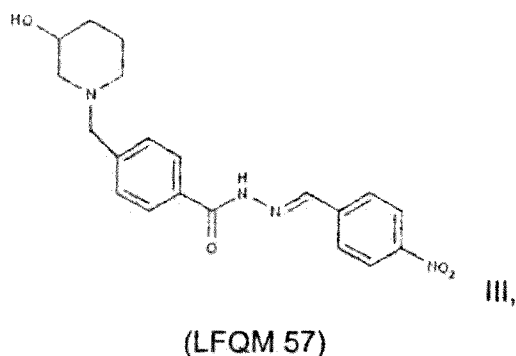
em que

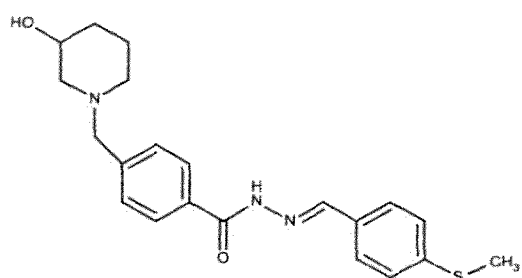
R1 é escolhido do grupo que consiste de: OH, CH₃CHOO, oxialquila, oxiarila e carbamoila; e

R2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolinil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc, triazolila, aminoalquila, aminoarila, O-alquila, arila, carbamoila, NHCO-alquila, e NHCO-arila.

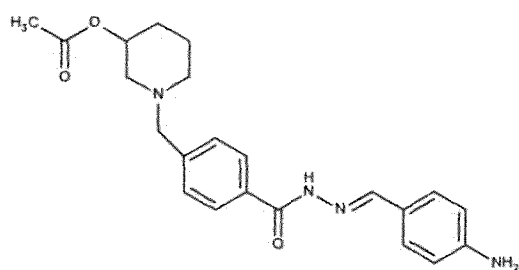
4. Composto de acordo com a reivindicação 3 **caracterizado** por R1 ser escolhido do grupo que consiste de: OH e CH₃CHOO; e R2 ser escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO₂, OMe, 3-pirrolidinil, F, NH₂, 4-morfolil, 4-piperidinil, imidazol, SMe e OAc.

5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 **caracterizado** por ser escolhido do grupo que consiste dos compostos representados pelas fórmulas III a IX:

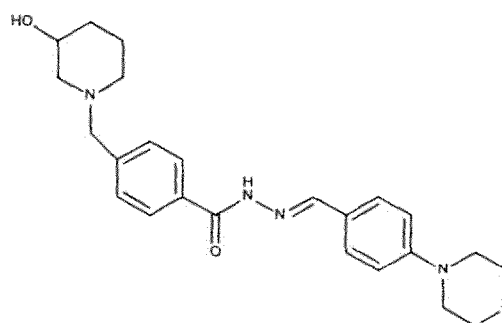




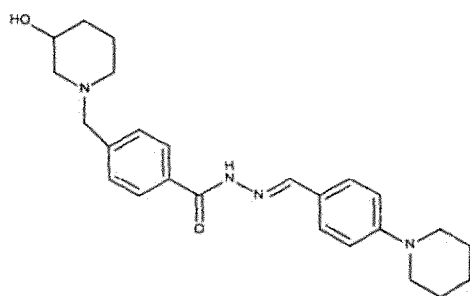
V, (LFQM 88)



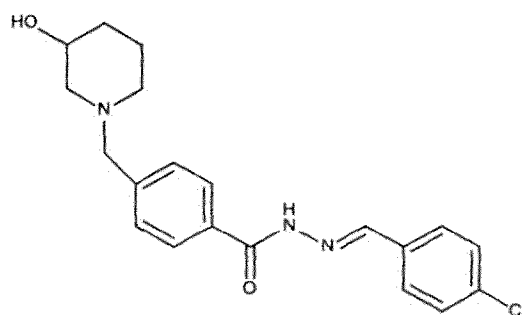
VI, (LFQM 73)



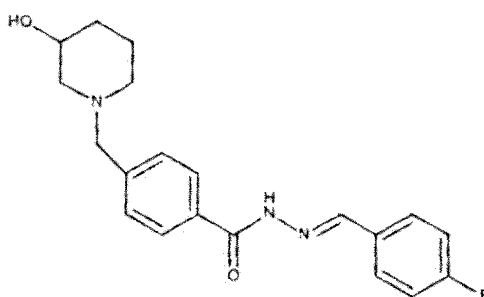
VII, (LFQM 74)



IV, (LFQM 75)



VIII, (LFQM 56)



IX. (LFQM 67).

6. Processo de síntese de composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) reação de esterificação do ácido 4-formil-benzóico (ou 4-carboxibenzaldeído) em solvente clorado ou em solvente não clorado, na presença de composto transferidor de grupo halogênio e de dimetilformamida (DMF);
- b) adição de álcool primário, secundário ou terciário;
- c) reação de aminação redutiva entre o produto obtido em b) e 3-hidroxipiperidina, na presença de NaBH_3CN , ácido de Lewis, MeOH e N_2 ;
- d) reação do produto obtido em c) com monoidrato de hidrazina; e
- e) reação do produto obtido em d) com benzaldeído R^2 -substituído em que R^2 é escolhido do grupo que consiste de: H, Br, Cl, NO_2 , OMe, 3-pirrolidinil, F, NH_2 , 4-morfolil, 4-piperidinil, imidazol, SMe, OAc.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado** por compreender adicionalmente a etapa f) reação de acetilação com anidrido acético e 4-(N,N-dimetilamino)piridina (4-DMAP).

8. Composição farmacêutica anti-inflamatória, anti-colinesterásica e/ou para o tratamento curativo ou profilático de doença neurodegenerativa **caracterizada** por compreender um veículo farmaceuticamente aceitável pelo menos um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8 **caracterizada** pelo referido composto estar numa proporção entre 0,01% m/m e 95% m/m.

10. Uso de um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 **caracterizado** por ser para fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de doença neurodegenerativa.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10 **caracterizado** por ser para a fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de: doença de Alzheimer; doença de Huntington; amnésia; depressão nervosa; transtorno obsessivo compulsivo; e/ou esclerose lateral amiotrófica.

12. Uso de um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 **caracterizado** por ser para fabricação de uma composição anti-inflamatória e/ou anti-colinesterásica.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12 **caracterizado** por ser para a fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de doença neurodegenerativa escolhida do grupo que consiste de: doença de Alzheimer, doença de Huntington, amnésia, depressão nervosa, transtorno obsessivo compulsivo, esclerose lateral amiotrófica.

14. Forma de dosagem oral **caracterizada** por compreender pelo menos um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou um sal farmaceuticamente aceitável do referido composto e um veículo farmaceuticamente aceitável.

15. Forma de dosagem oral **caracterizada** pela dosagem variar entre 1 ng e 5 g.

16. Método de tratamento de doença neurodegenerativa **caracterizado** por compreender administração de um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 a um indivíduo portador de ou propenso a doença neurodegenerativa, em um regime de dose que varia entre 1µmol/kg do indivíduo e 300µmol/kg do indivíduo.

17. Método de acordo com a reivindicação 16 **caracterizado** por compreender administração de um composto conforme definido em qualquer

uma das reivindicações 1 a 5 a um indivíduo propenso a ou portador de: doença de Alzheimer; doença de Huntington; amnésia; depressão nervosa; transtorno obsessivo compulsivo; e/ou esclerose lateral amiotrófica.

18. Método de acordo a reivindicação 16 ou 17, **caracterizado** pela dose administrada ser 100 μ mol/kg do indivíduo.

19. Método de tratamento de inflamações **caracterizado** por compreender administração de um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 a um indivíduo acometido por ou propenso a inflamação, em um regime de dose que varia entre 1 μ mol/kg do indivíduo e 300 μ mol/kg do indivíduo.

20. Método de acordo com a reivindicação 19 **caracterizado** pela dose administrada ser 100 μ mol/kg do indivíduo.

21. Método de inibição da enzima acetilcolinesterase **caracterizado** por compreender contatar composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 com a enzima acetilcolinesterase.

FIGURAS

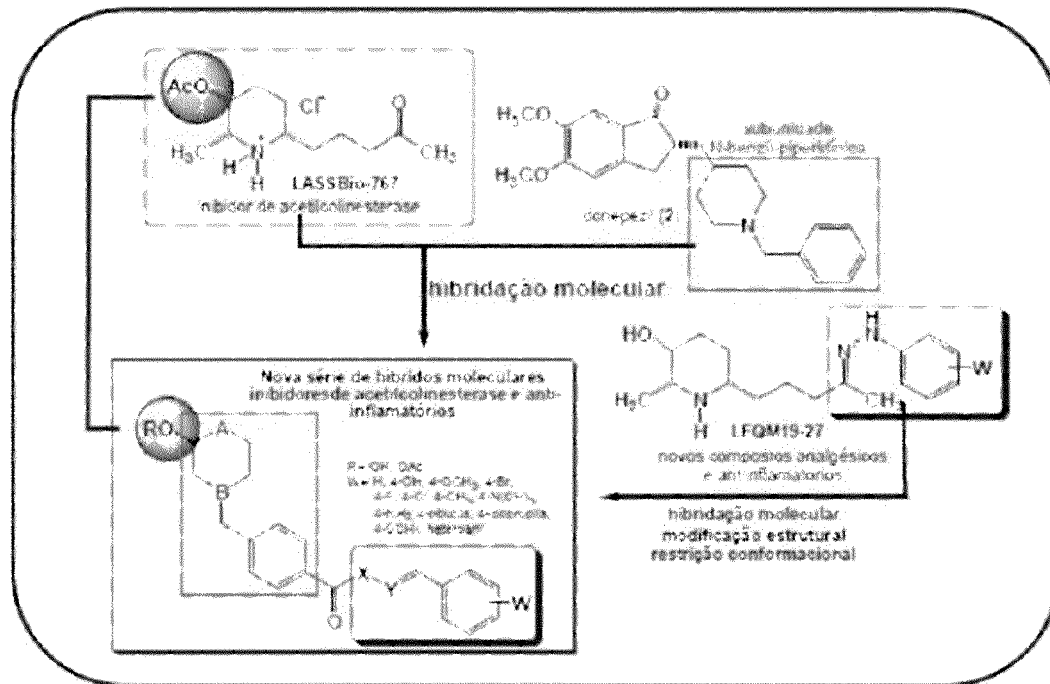
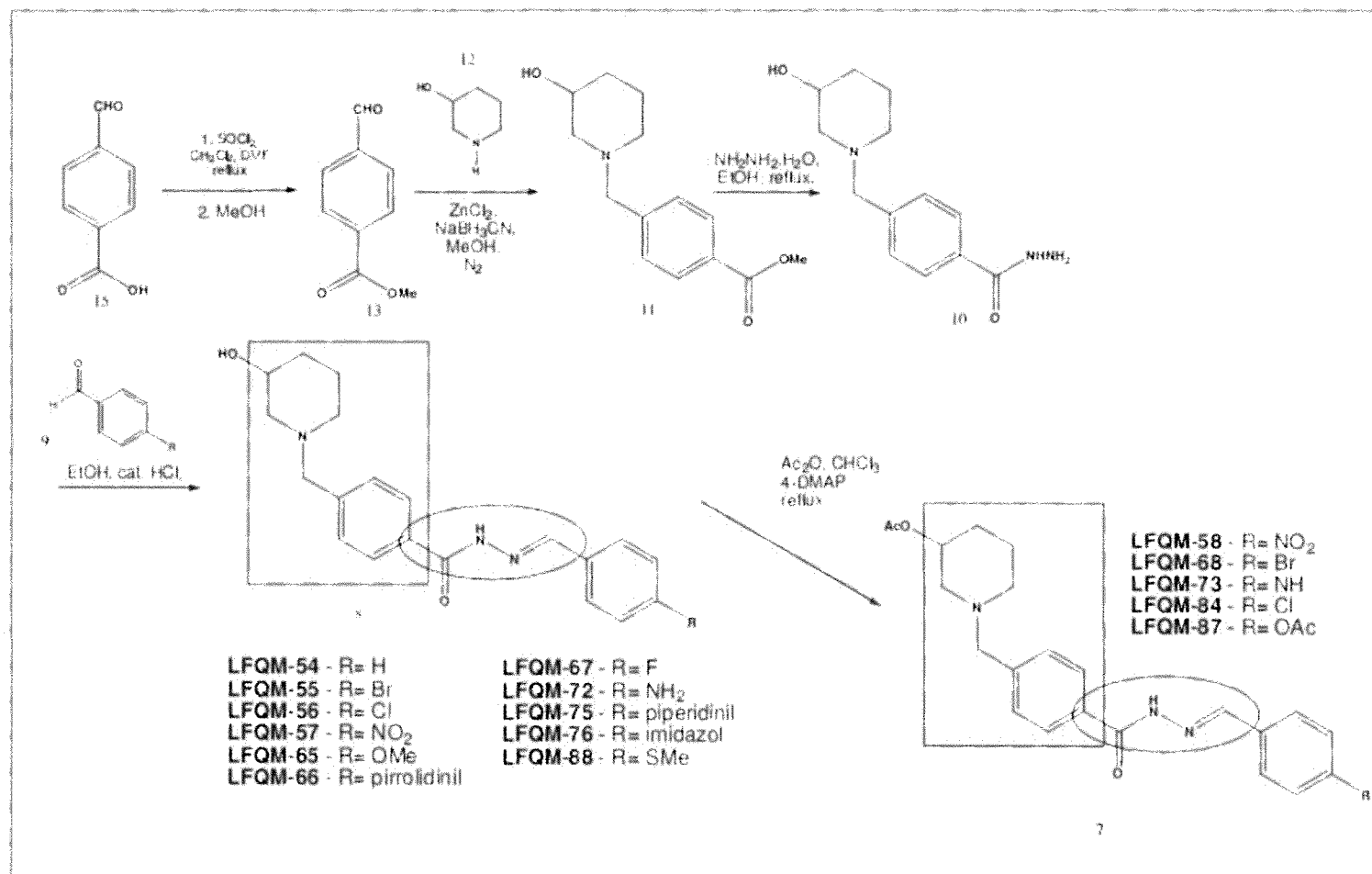


Figura 1

Figura 2



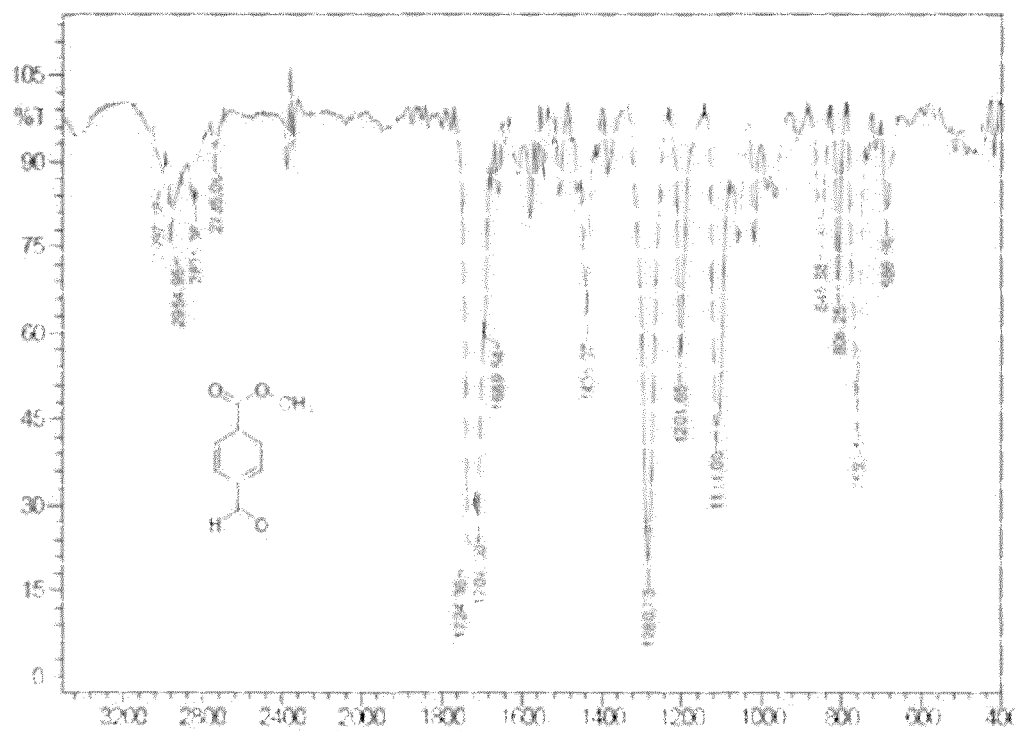


Figura 3

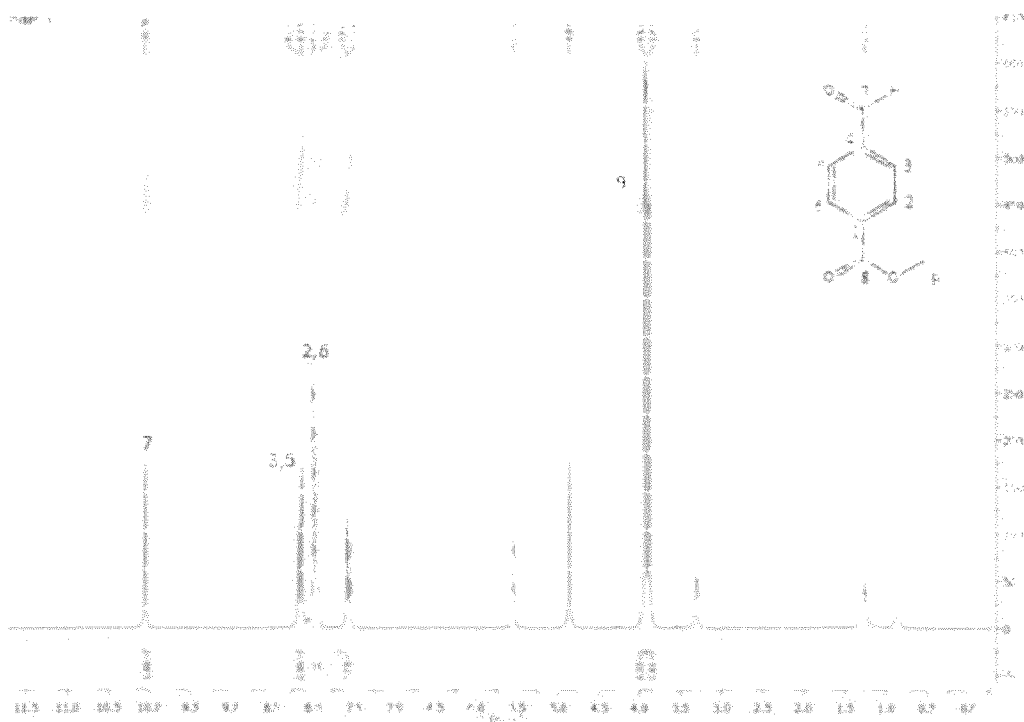


Figura 4

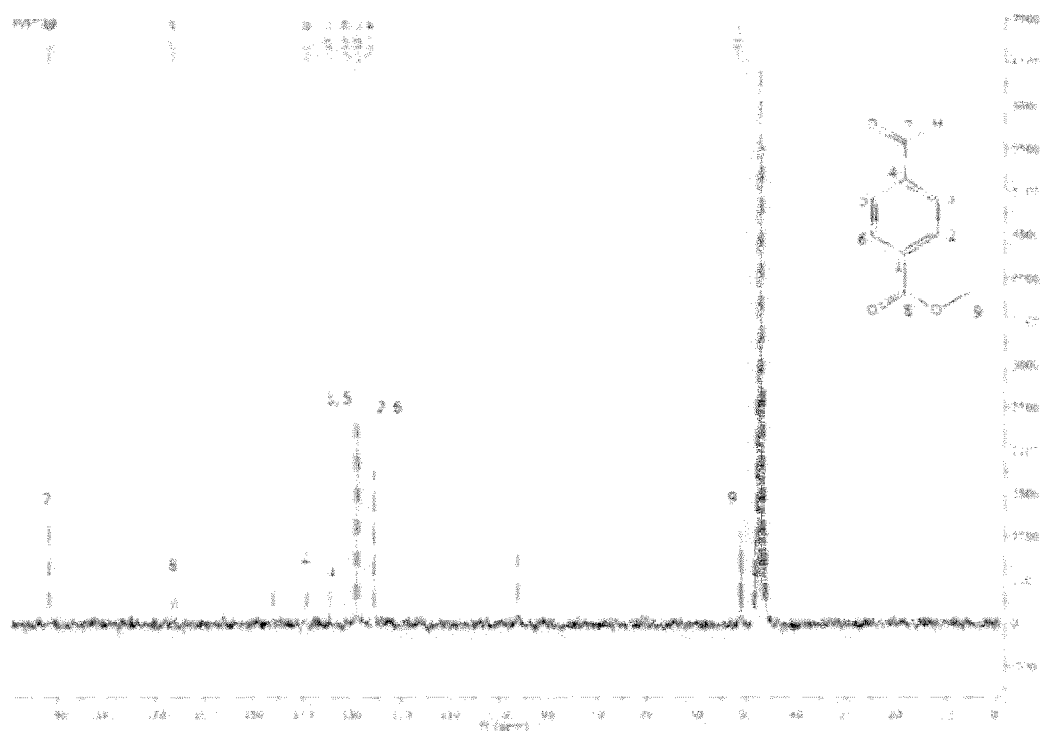


Figura 5

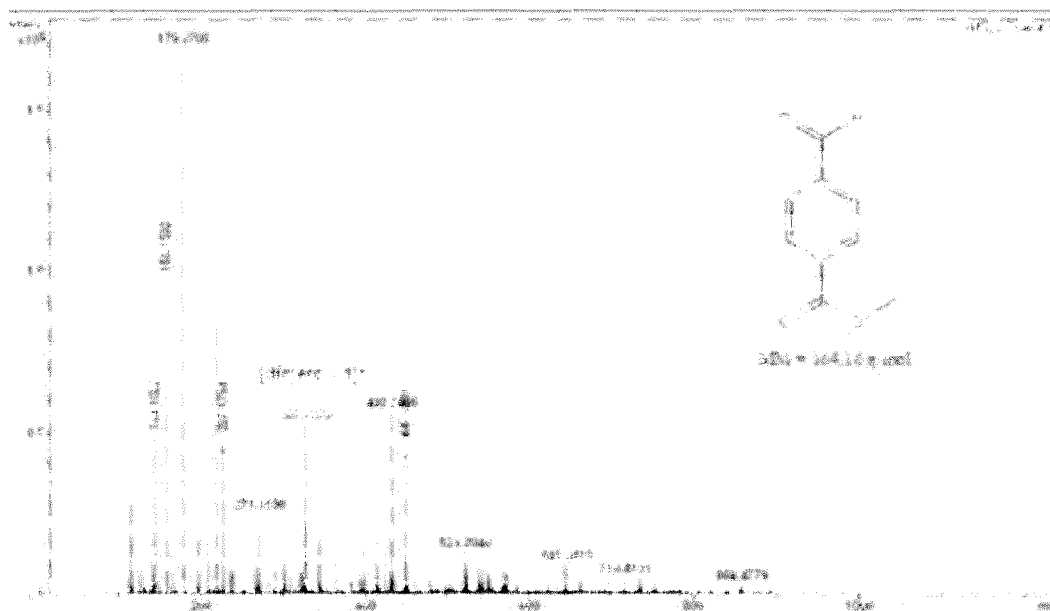


Figura 6

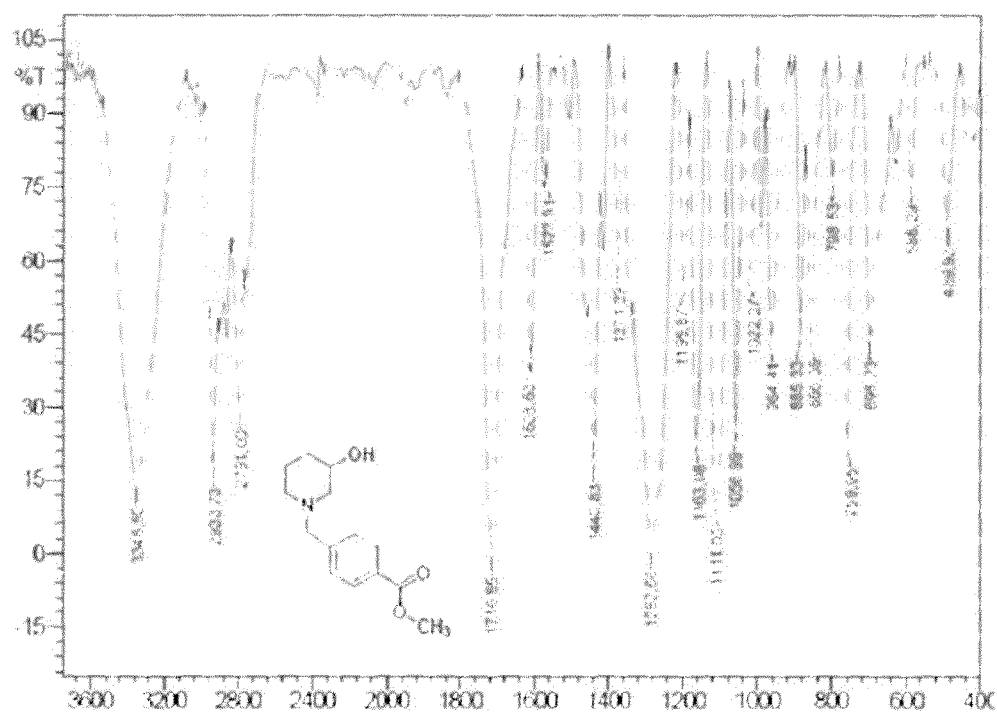


Figura 7

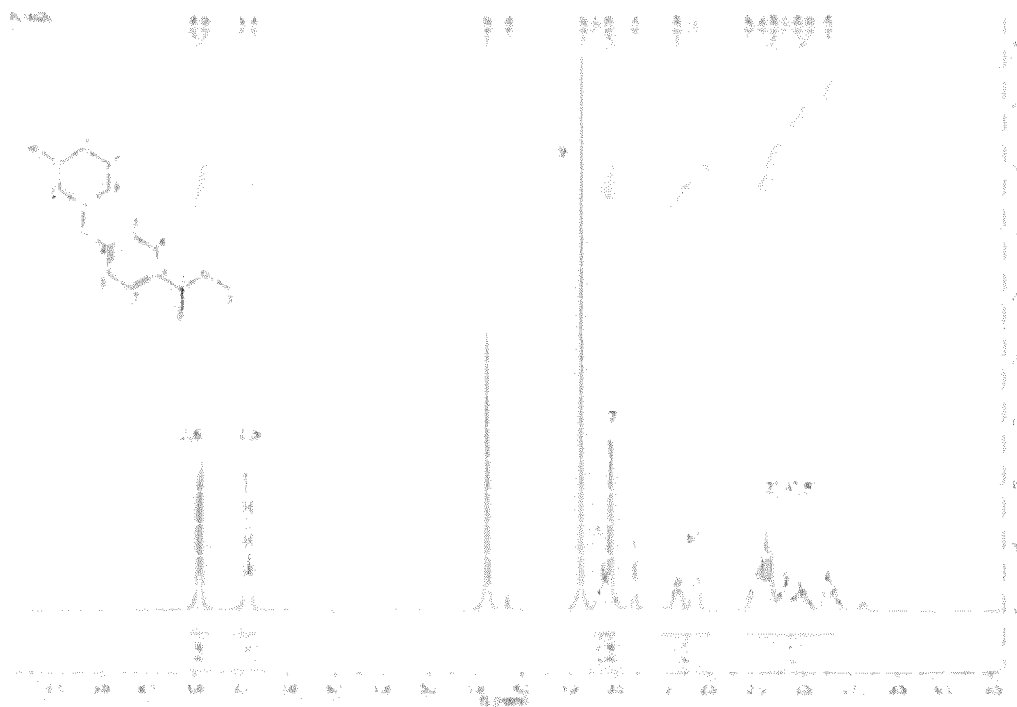


Figura 8

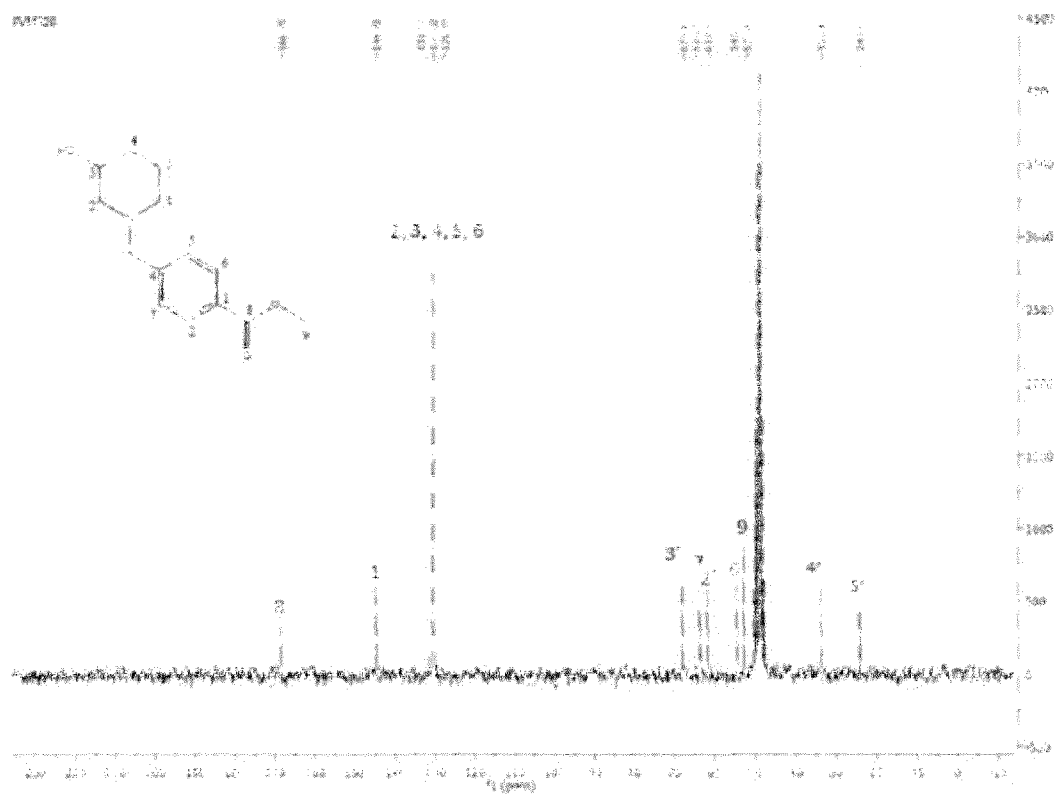


Figura 9

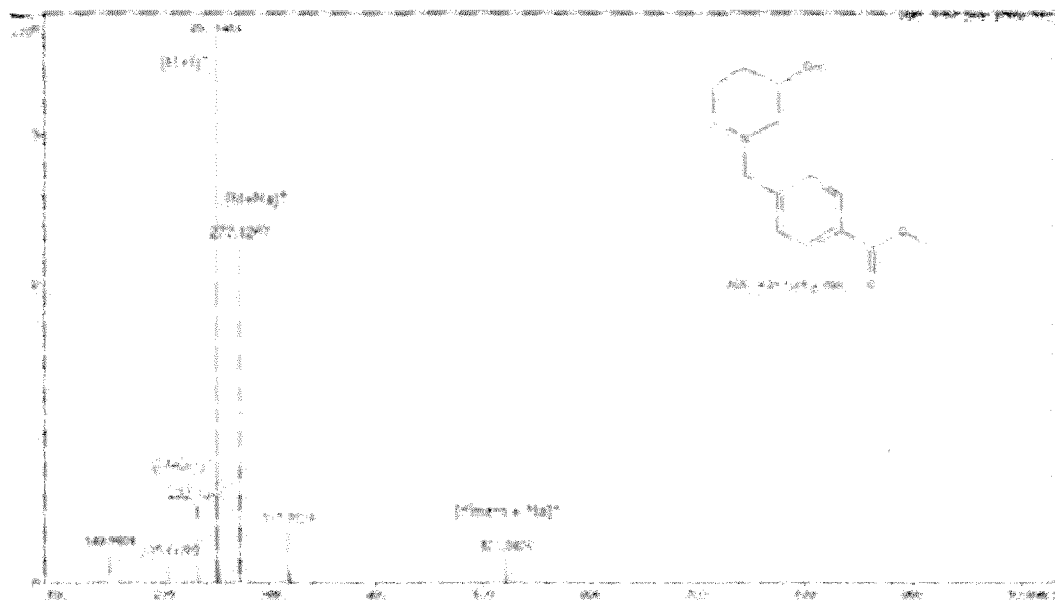


Figura 10

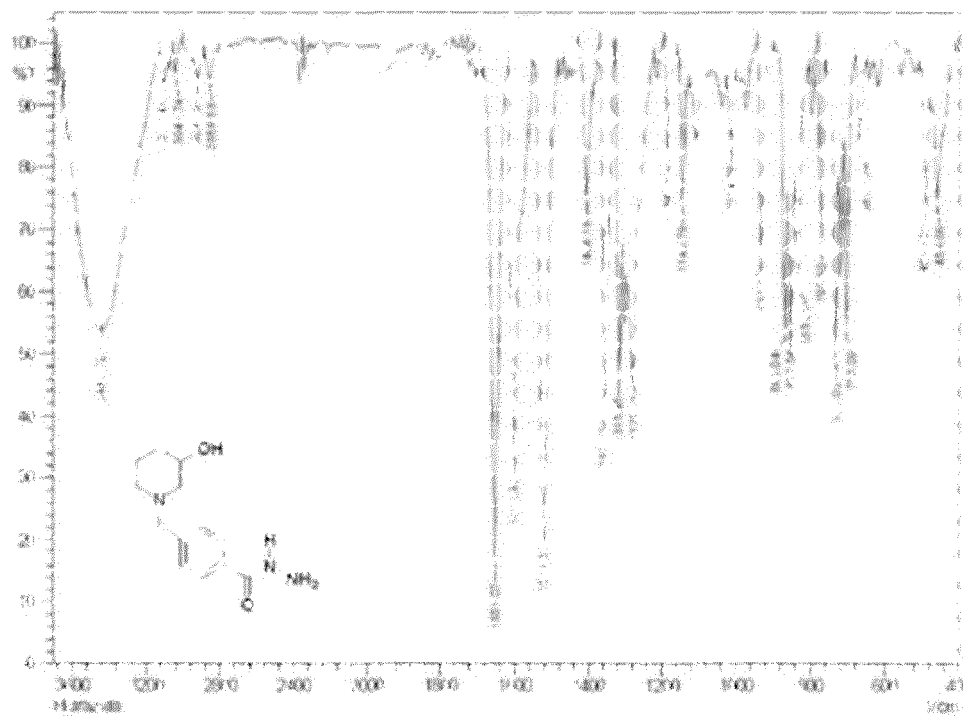


Figura 11

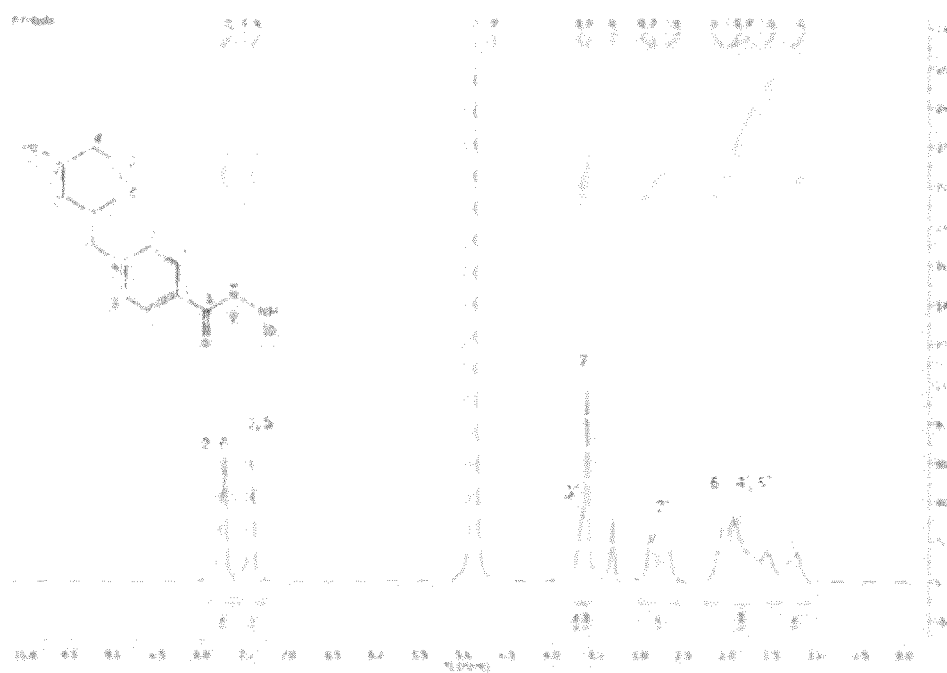


Figura 12

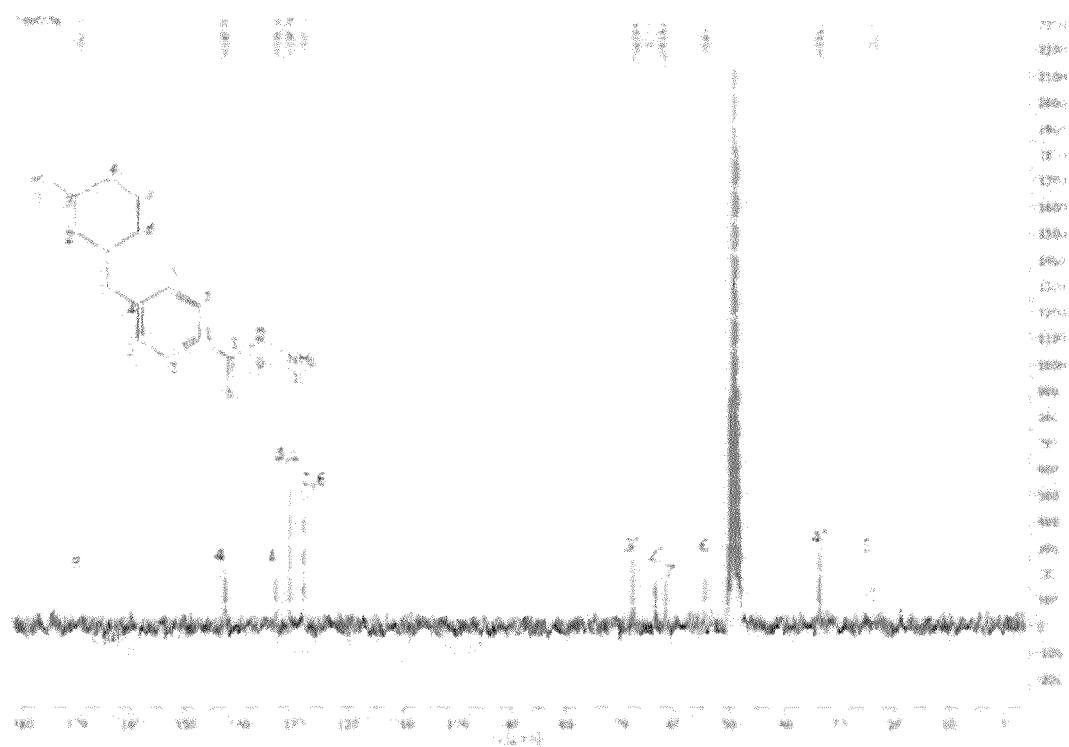


Figura 13

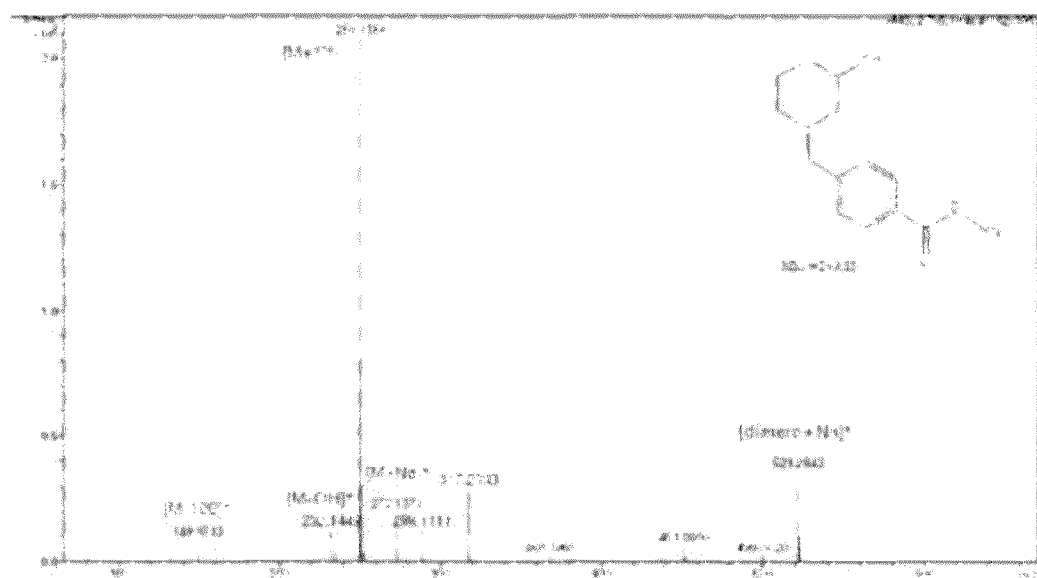


Figura 14

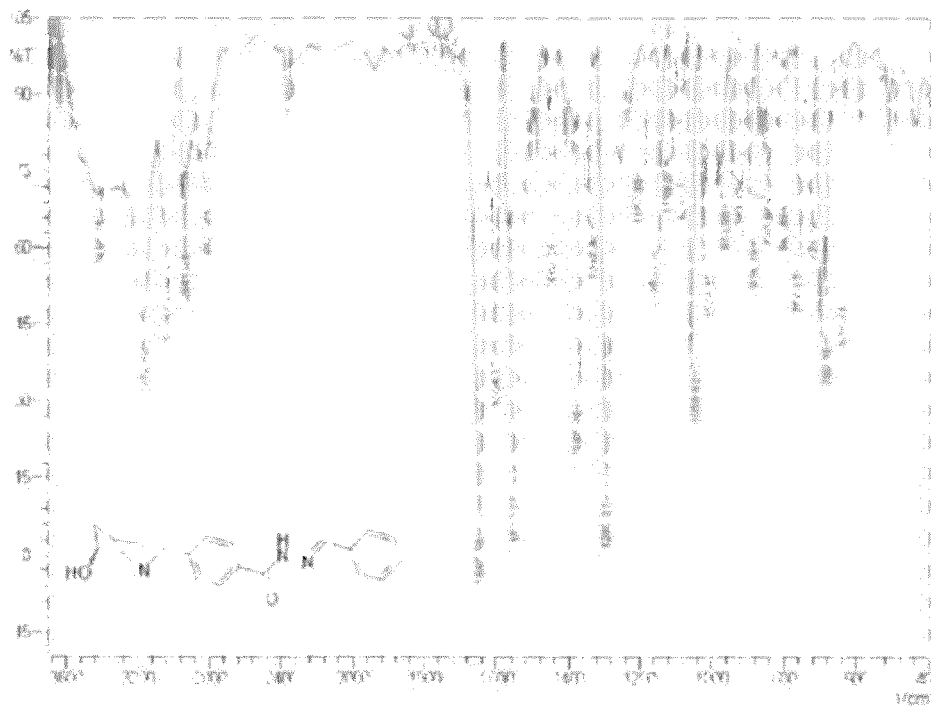


Figura 15

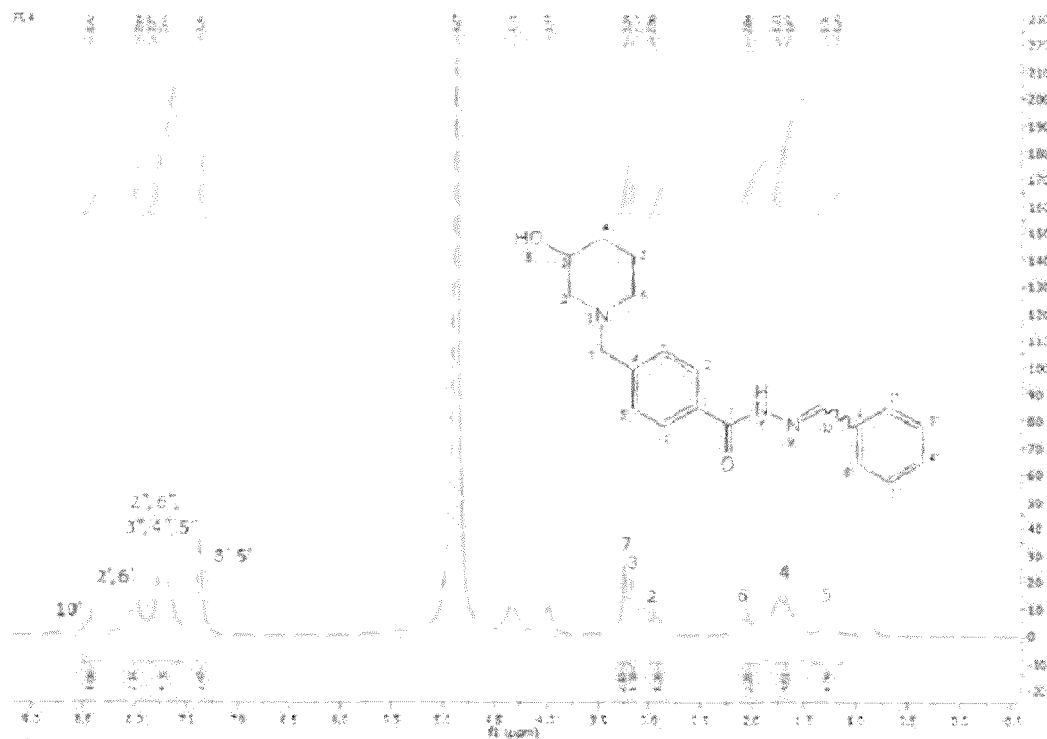


Figura 16

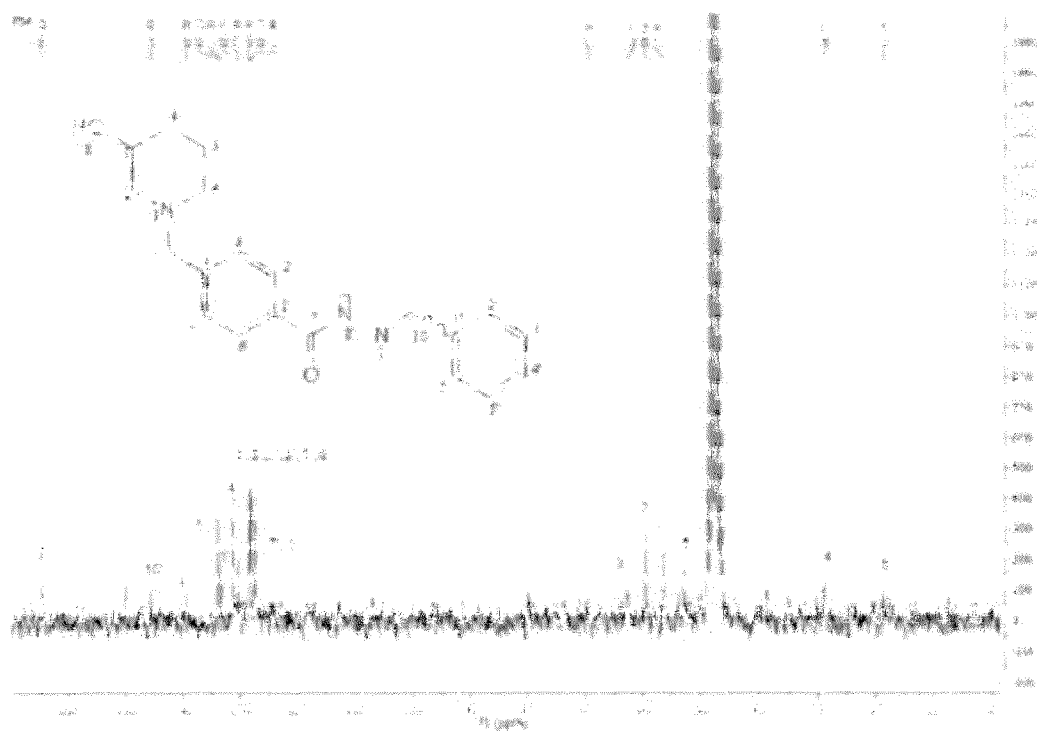


Figura 17

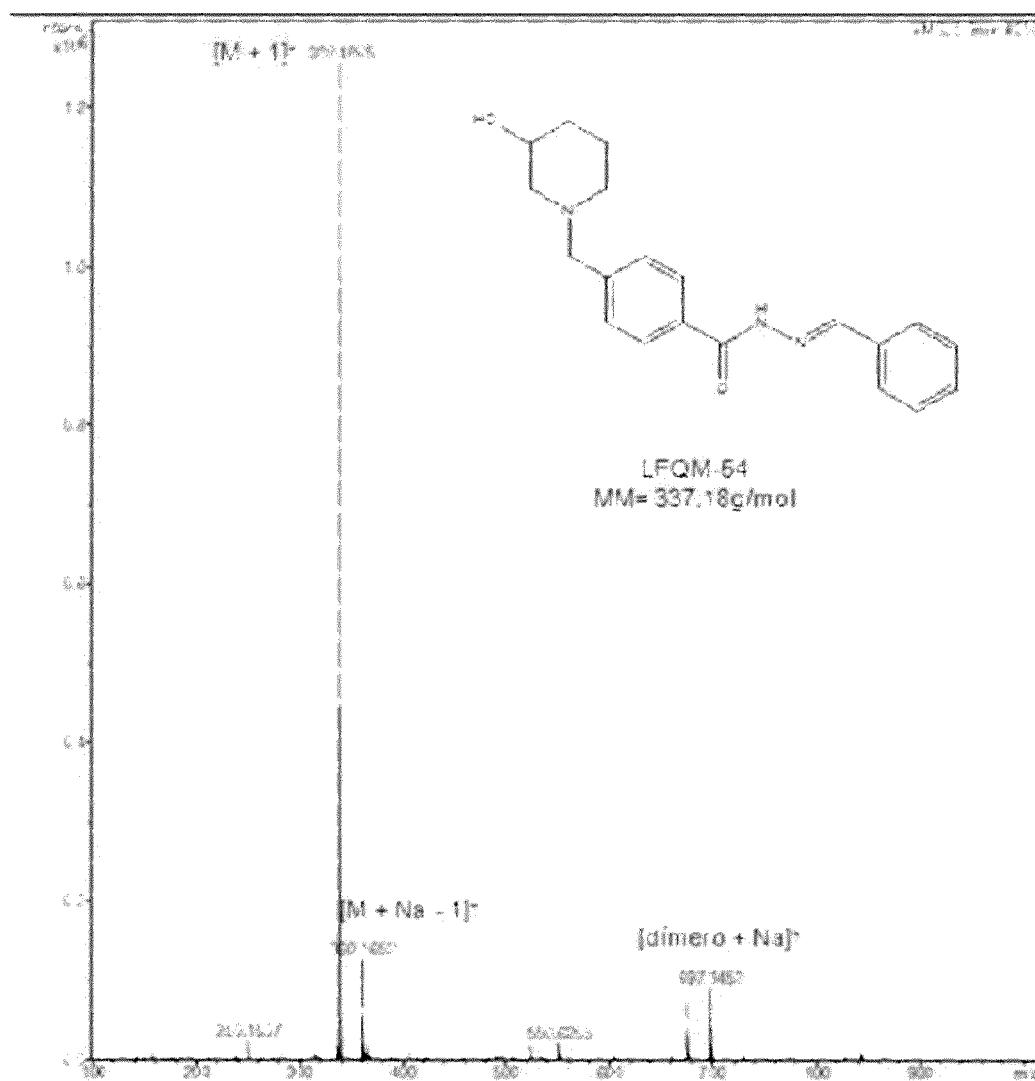


Figura 18

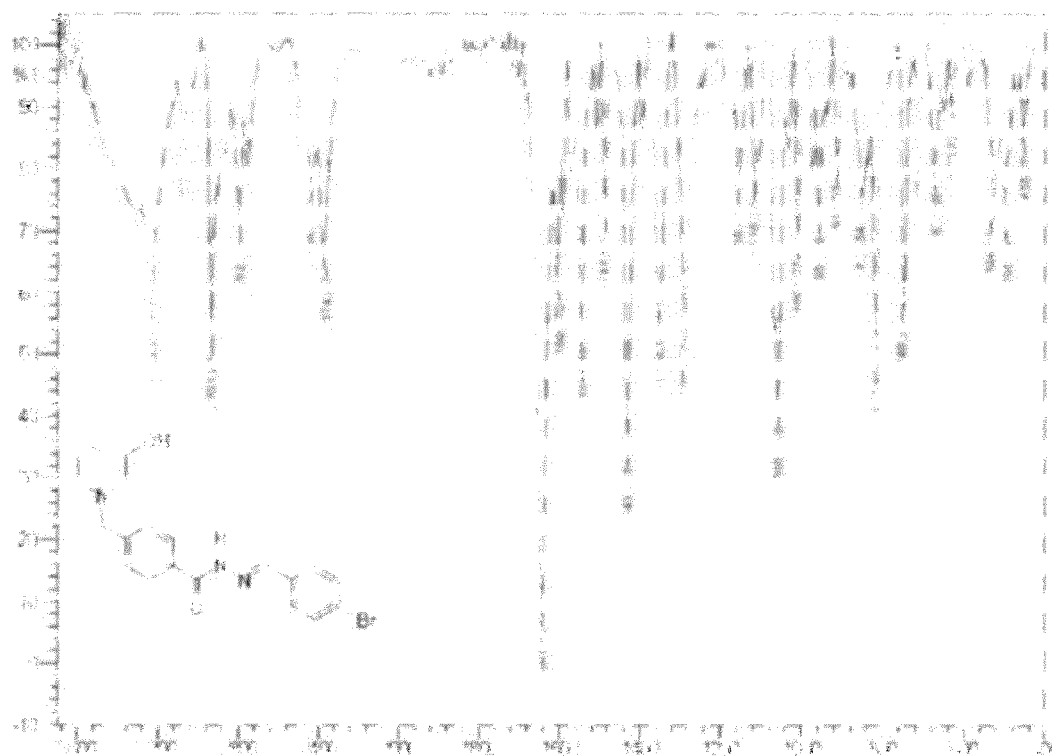


Figura 19

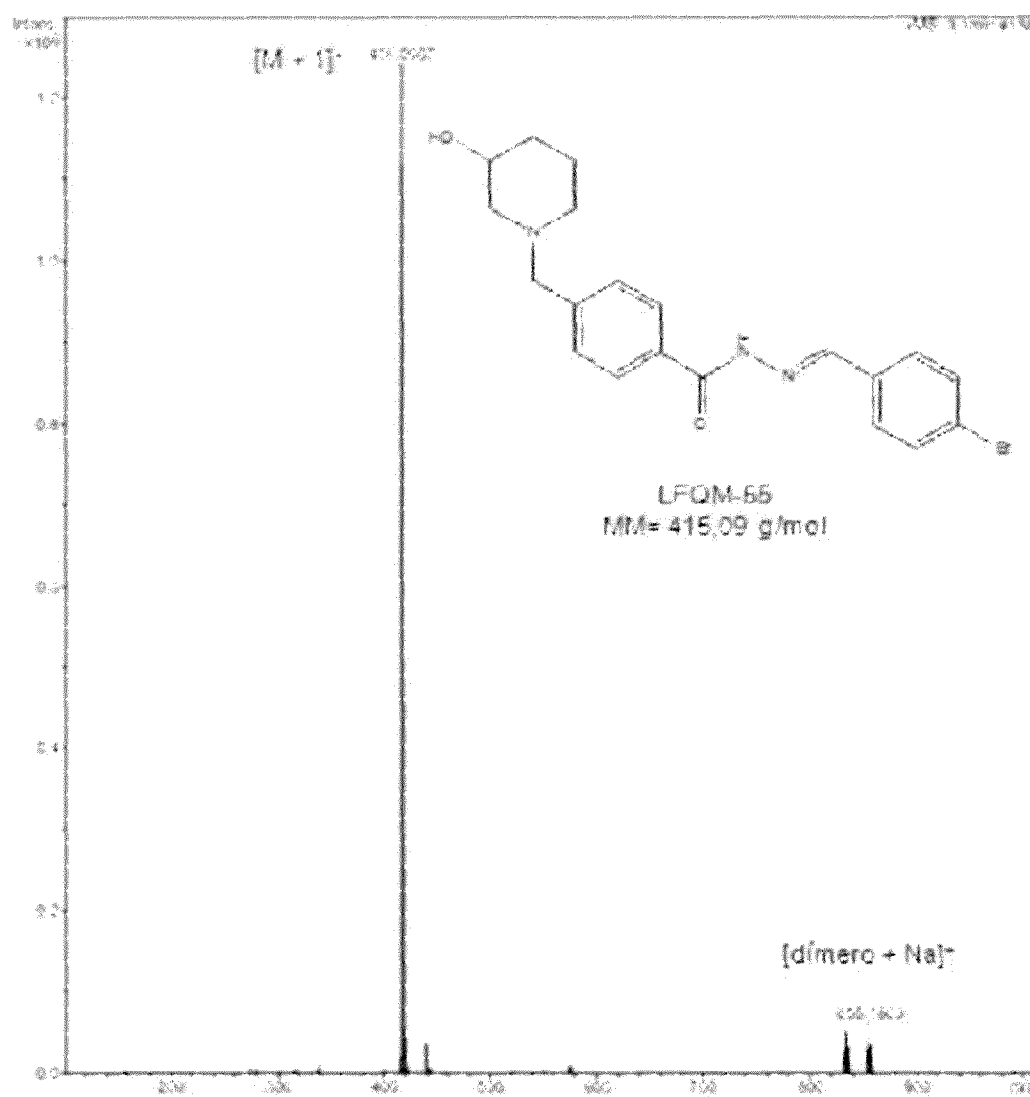


Figura 20

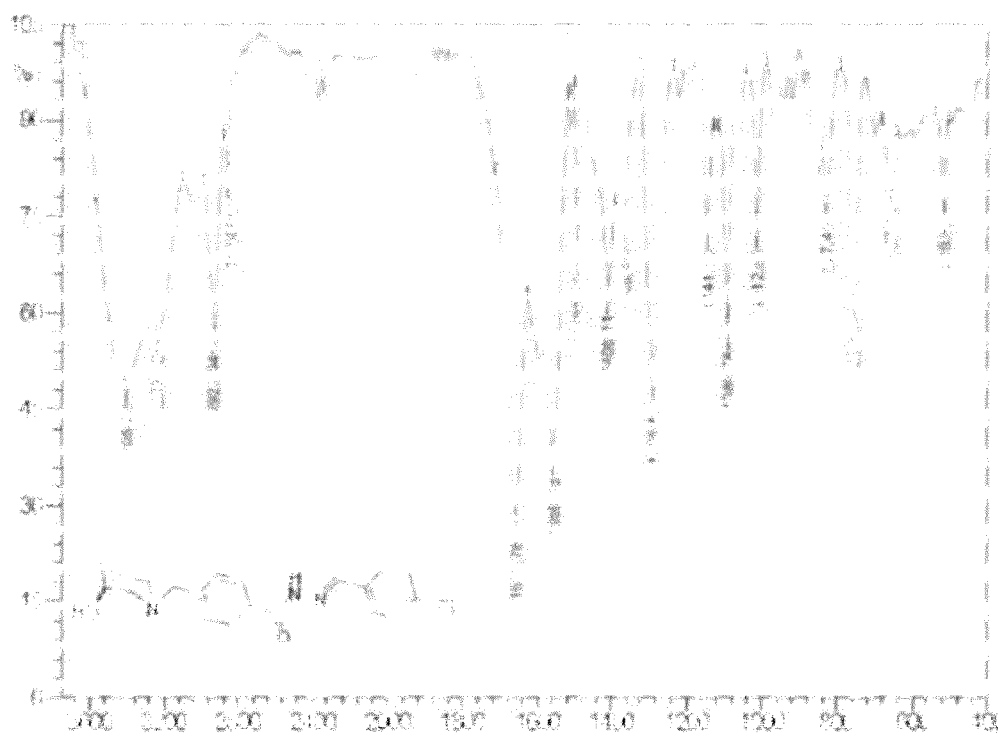


Figura 21

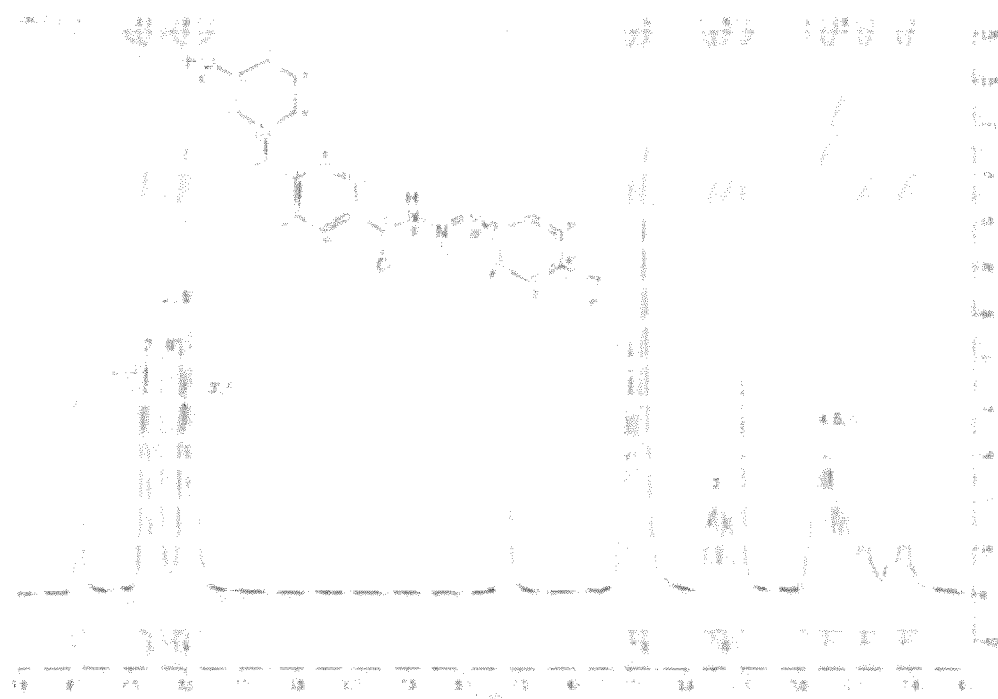


Figura 22

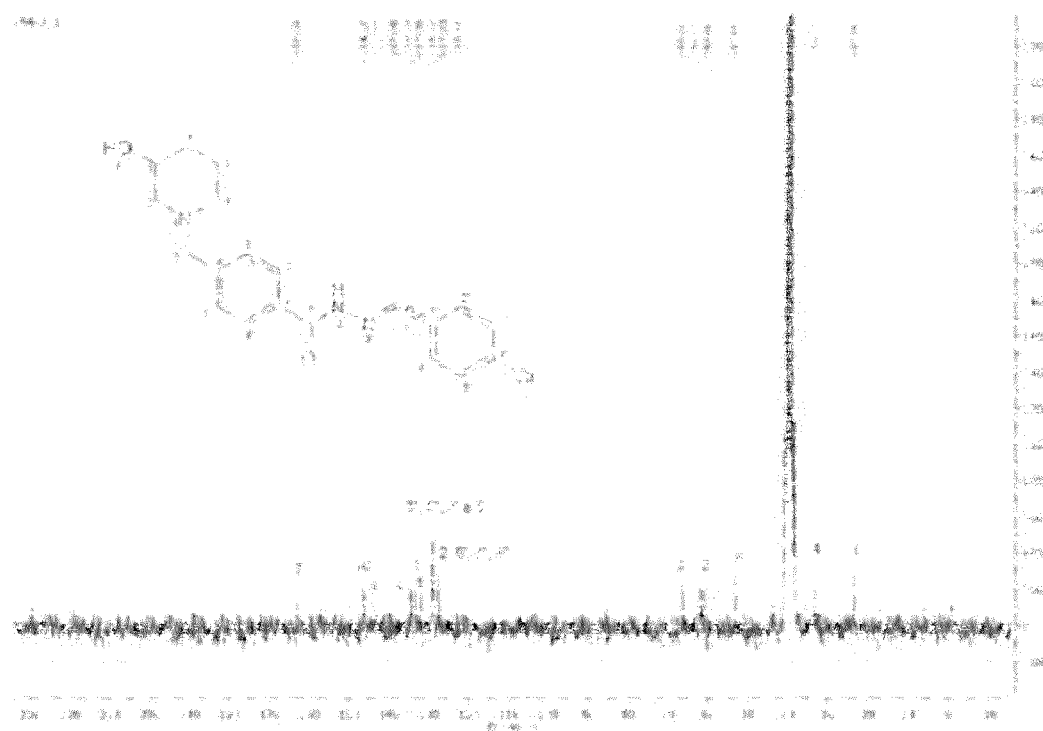


Figura 23

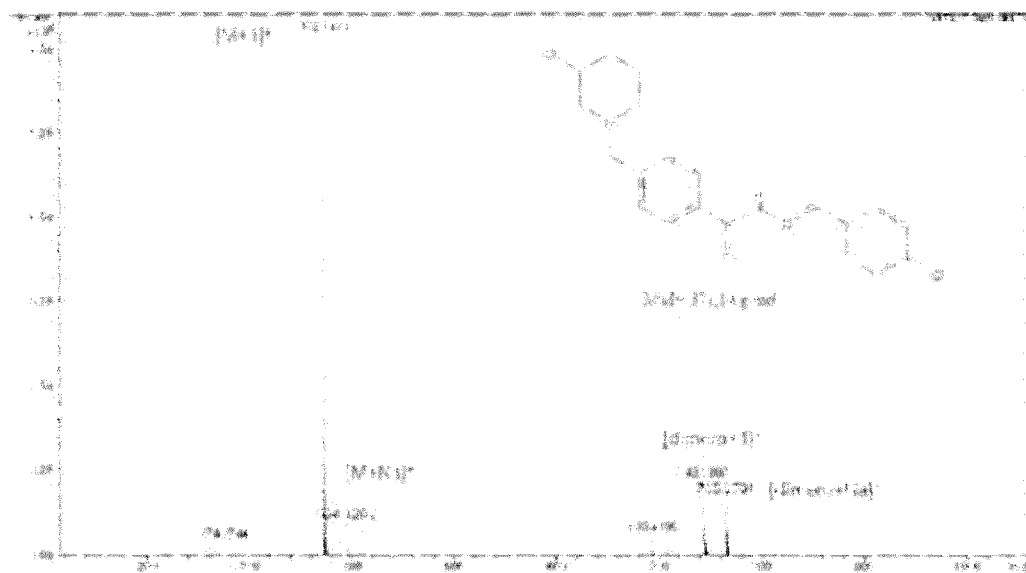


Figura 24

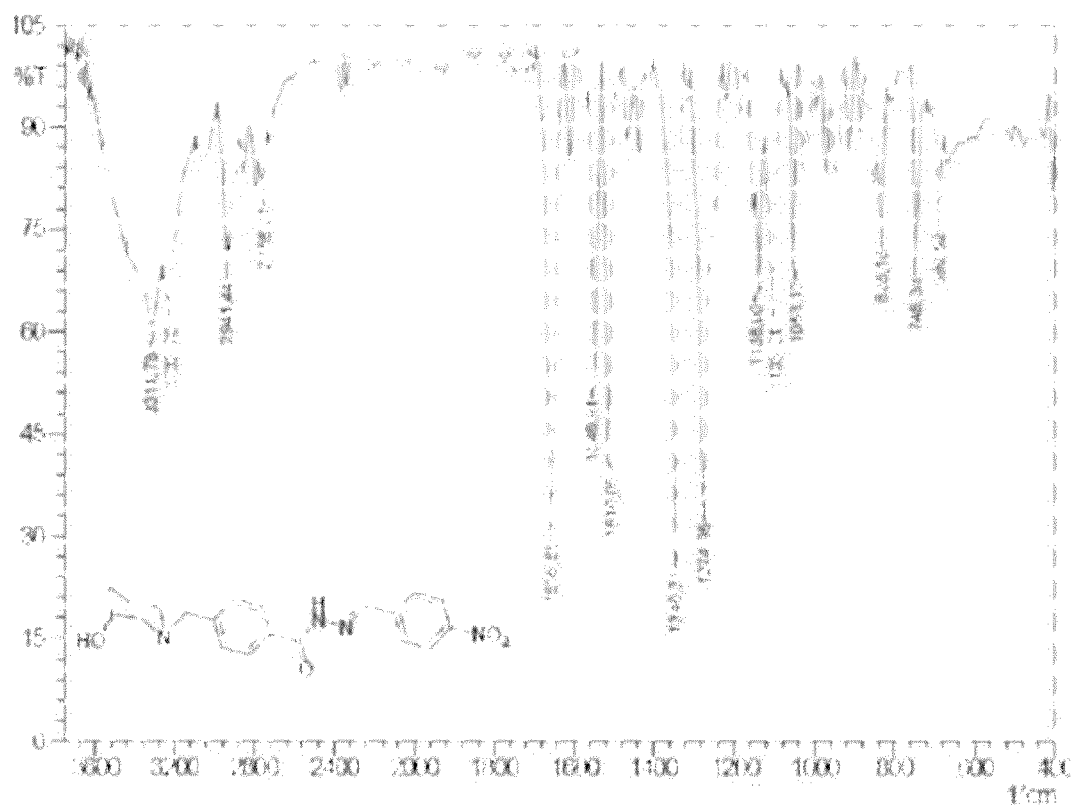


Figura 25

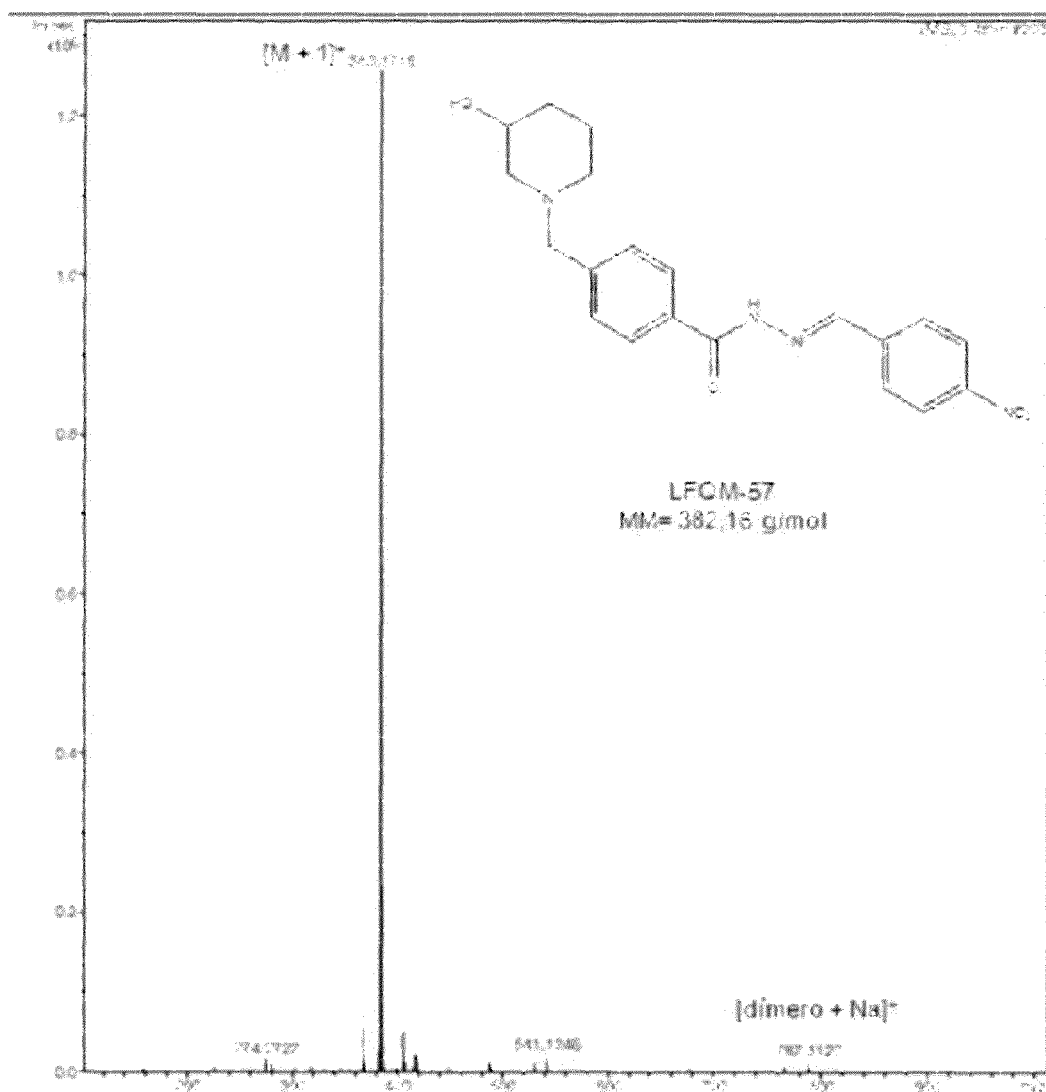


Figura 26

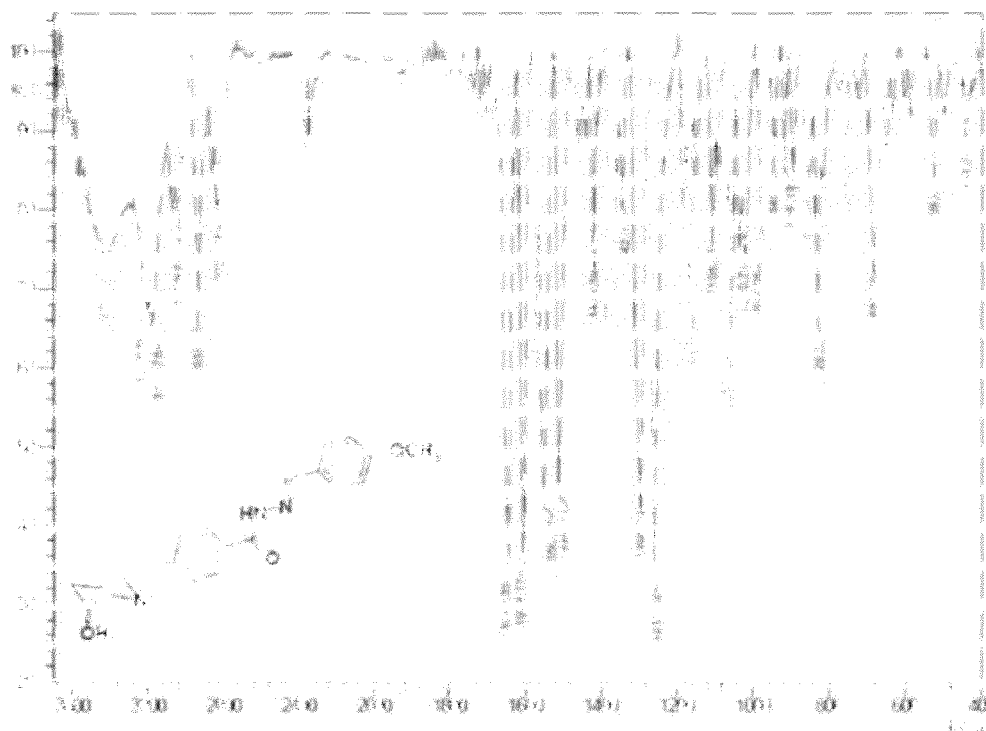


Figura 27

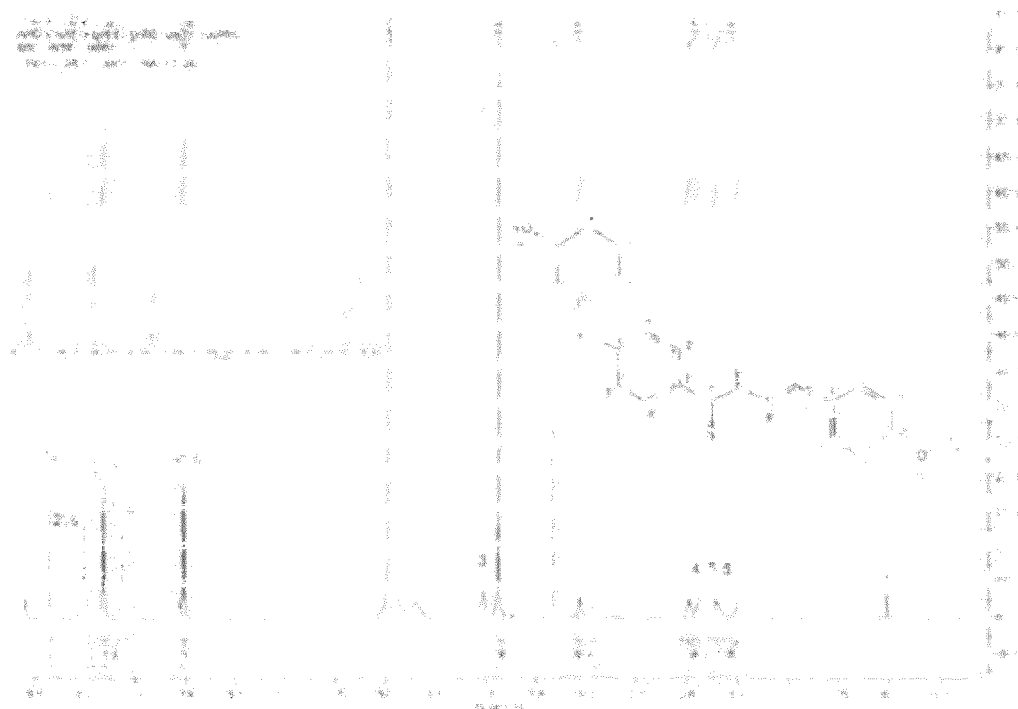


Figura 28

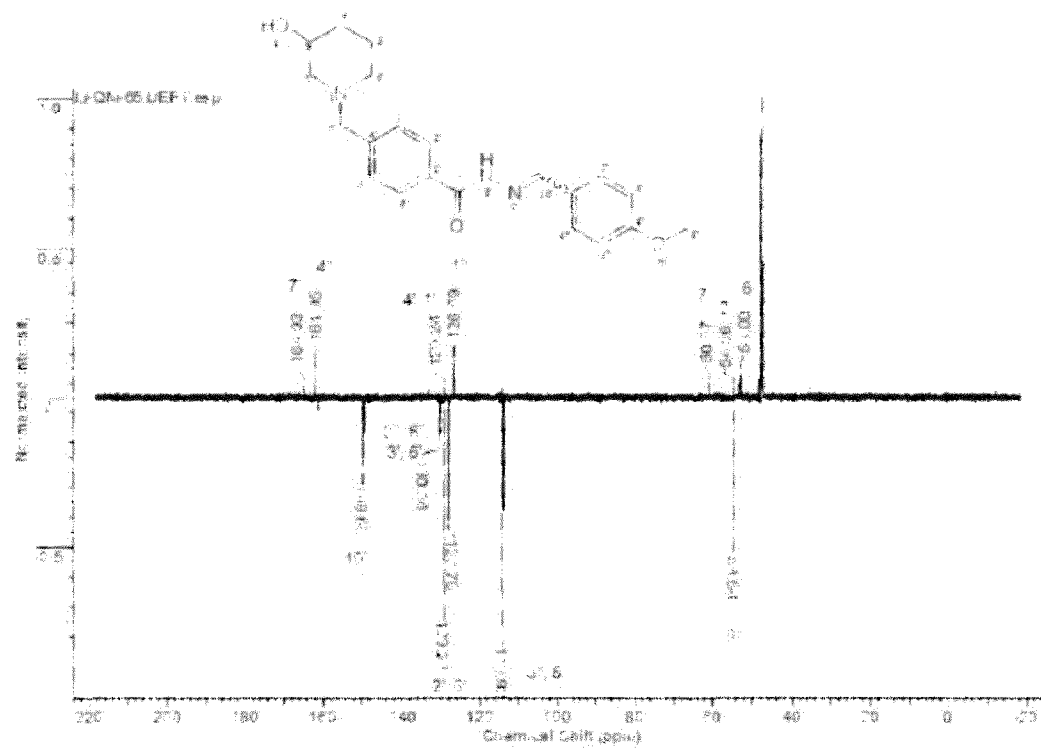


Figura 29

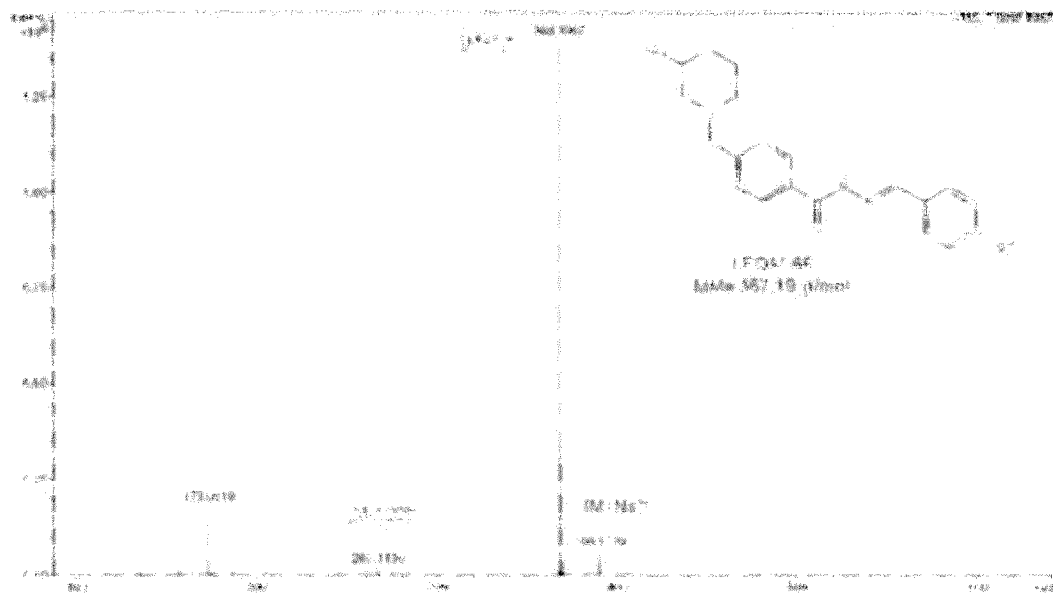


Figura 30

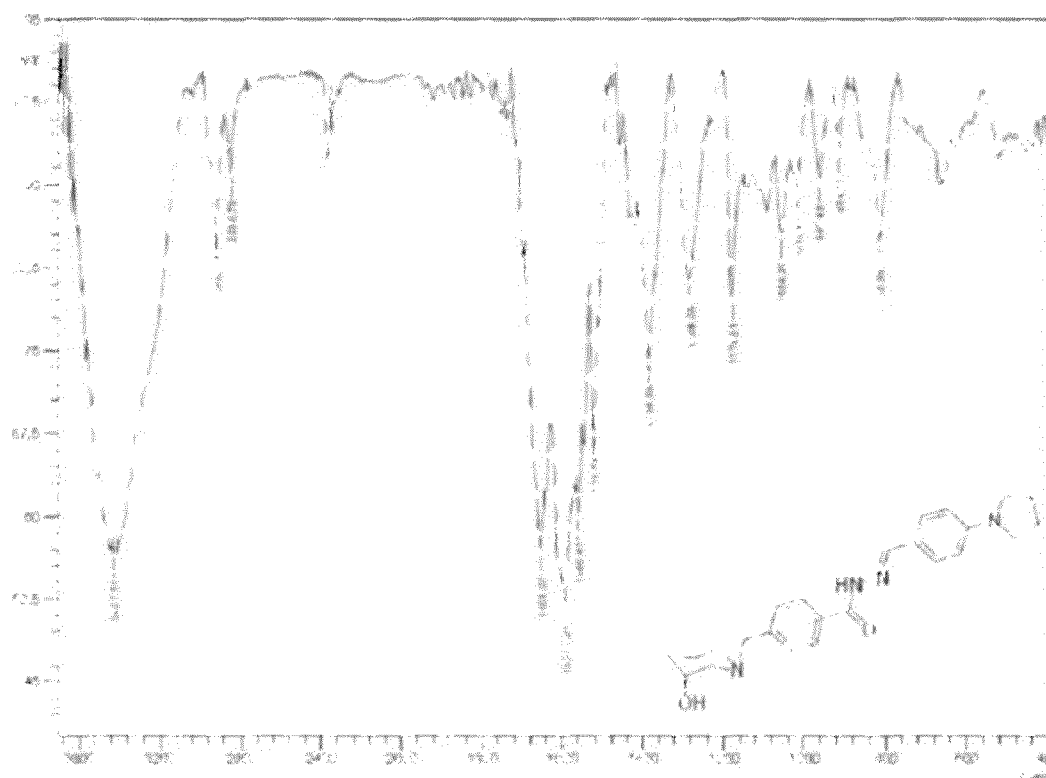


Figura 31

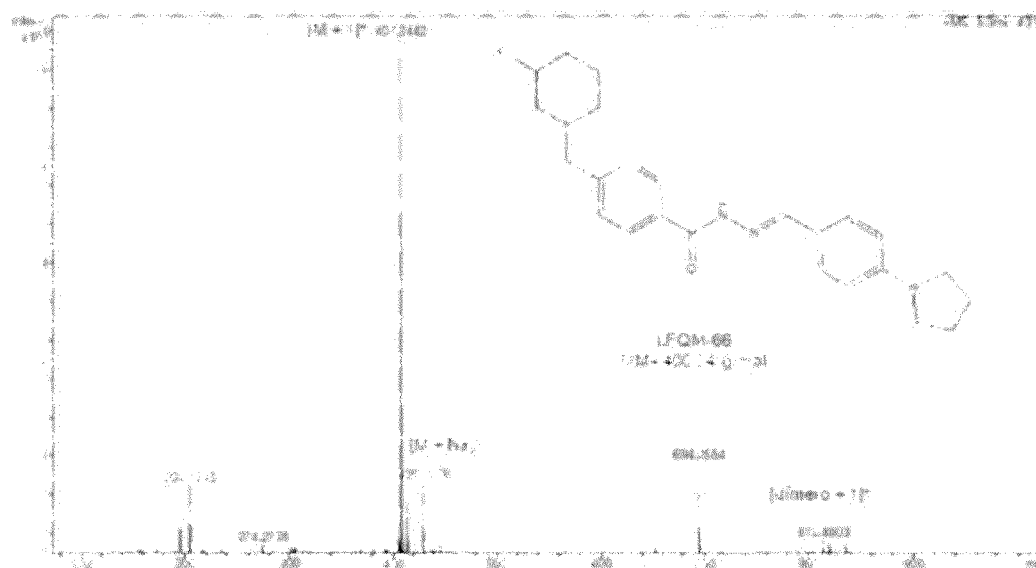


Figura 32

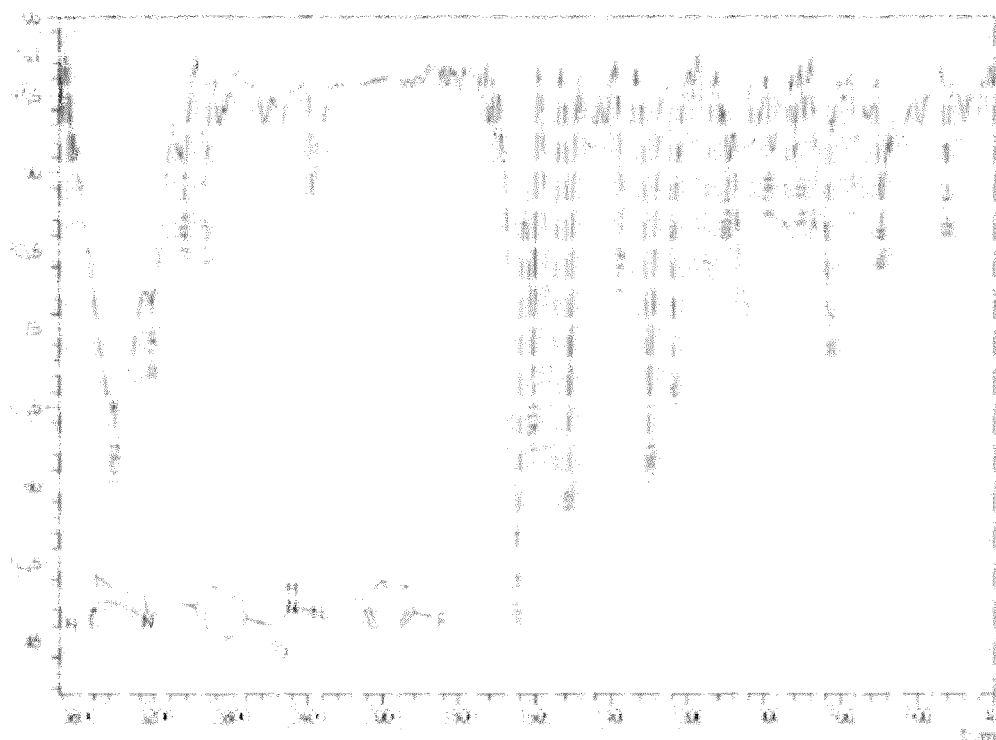


Figura 33

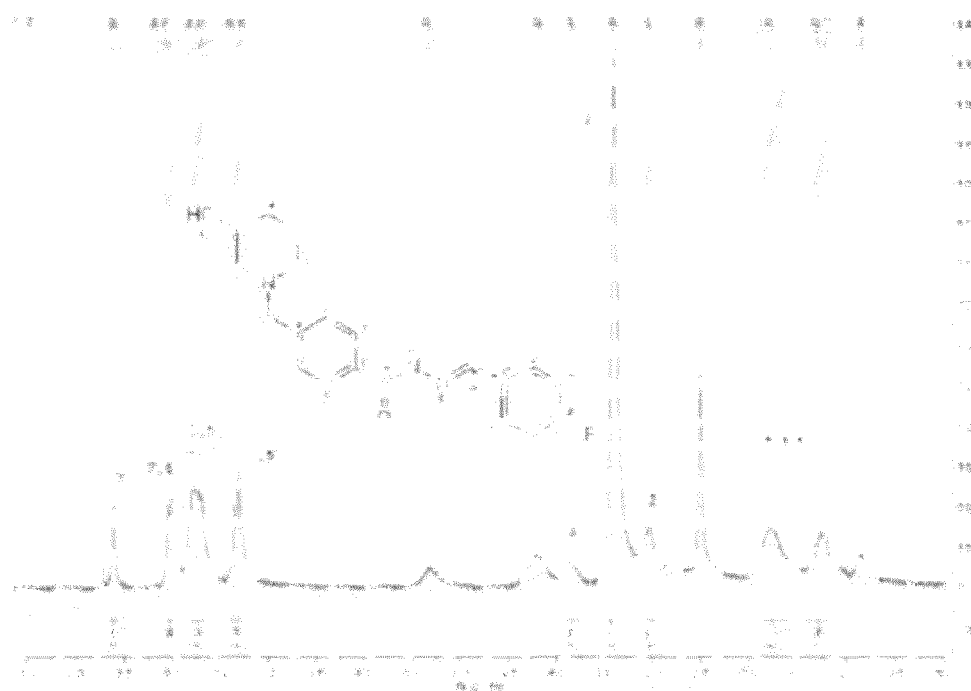


Figura 34

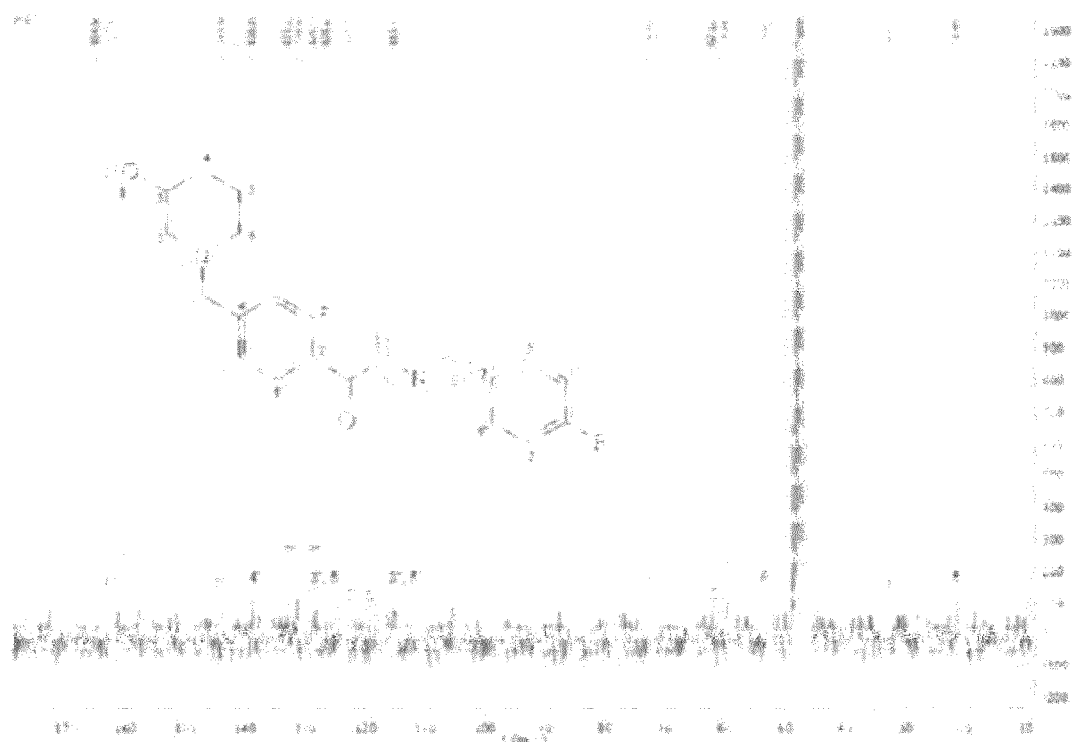


Figura 35

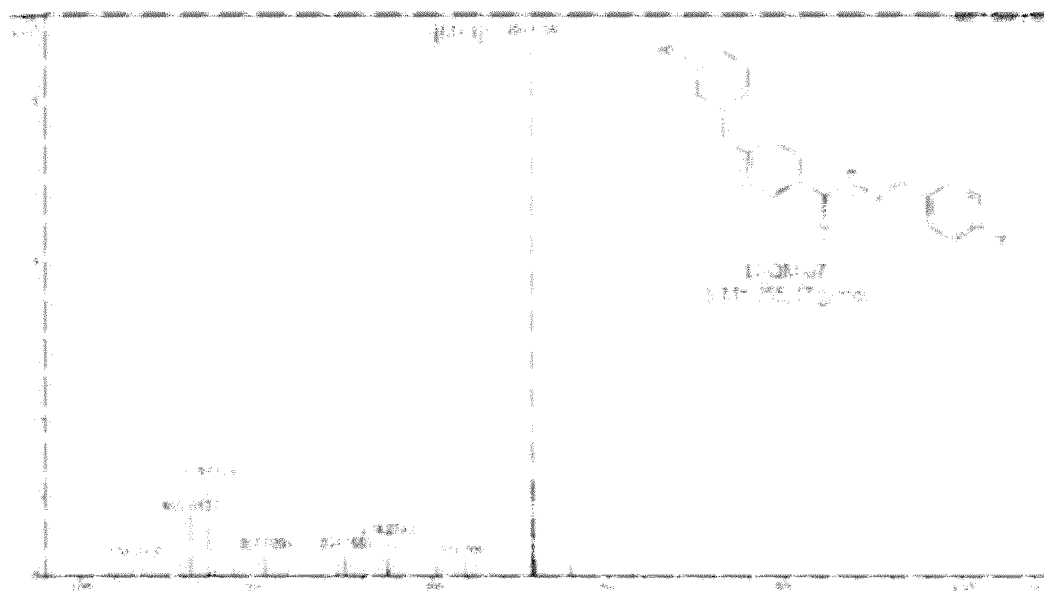


figura 3b

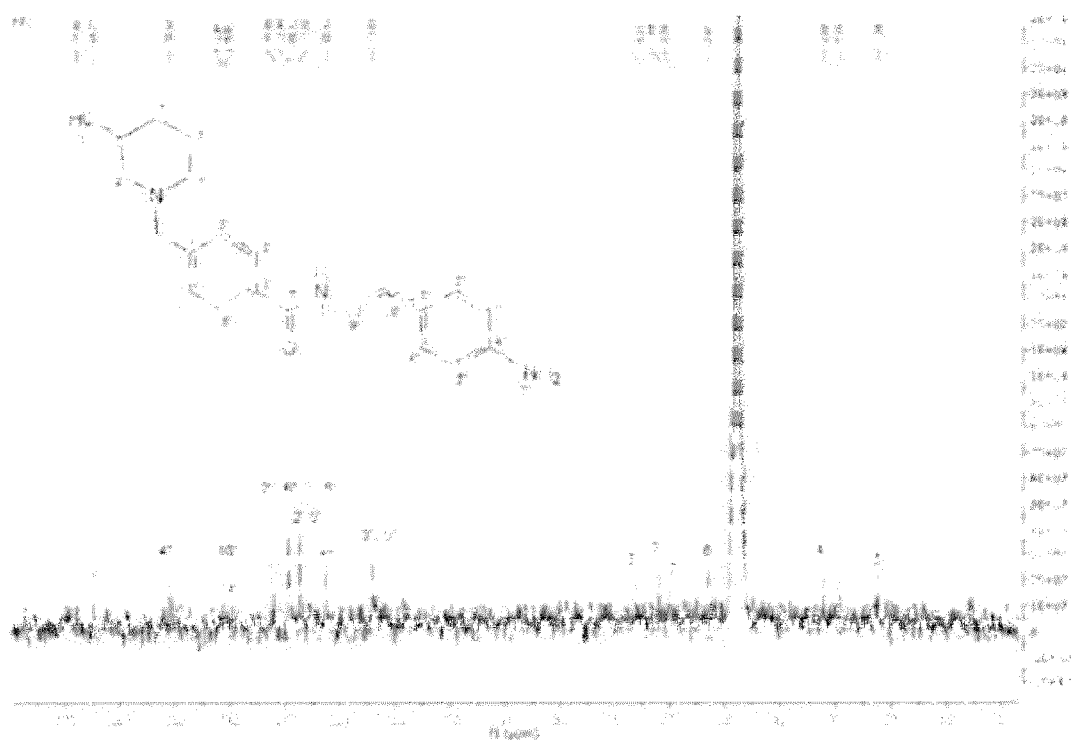


Figura 39

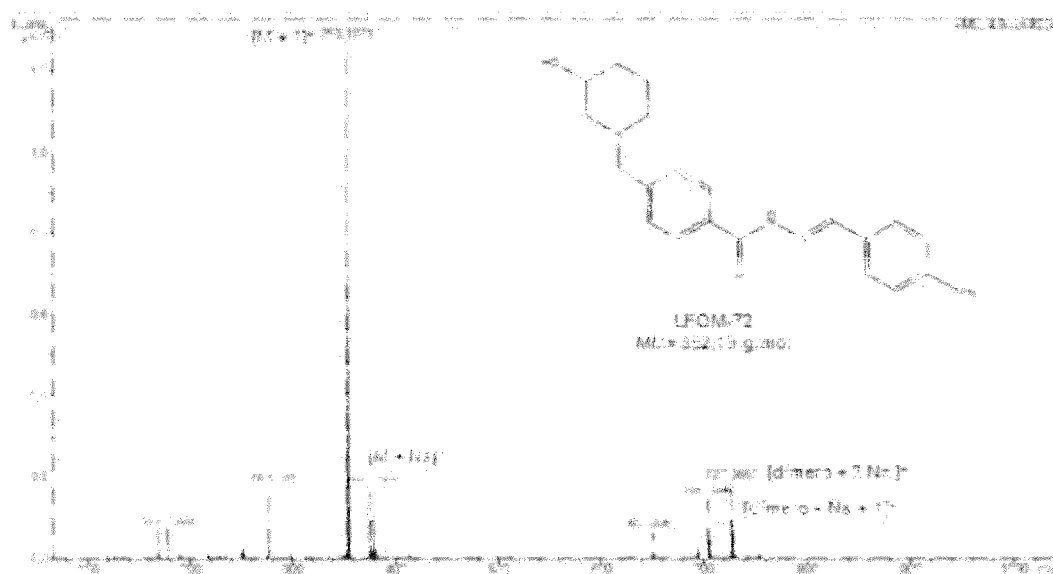


Figura 40

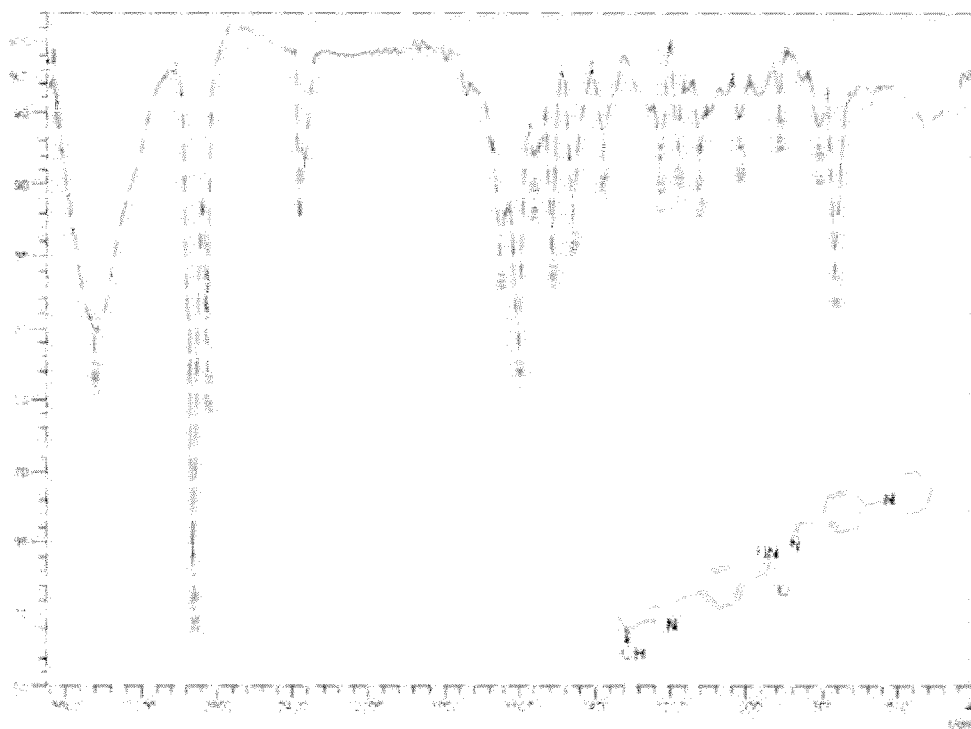


Figura 41

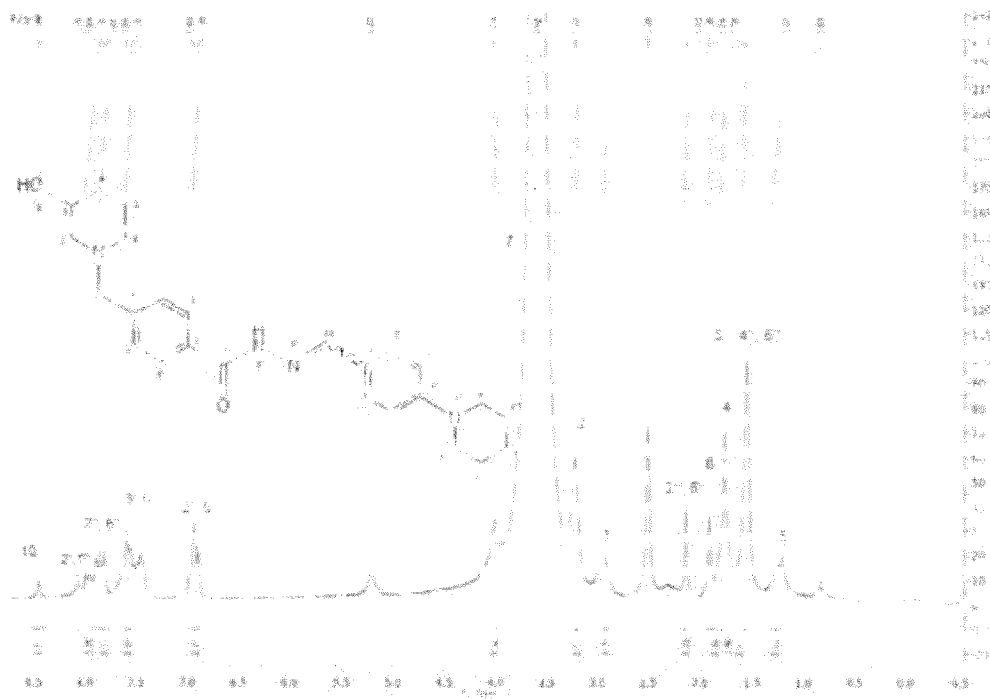


Figura 42

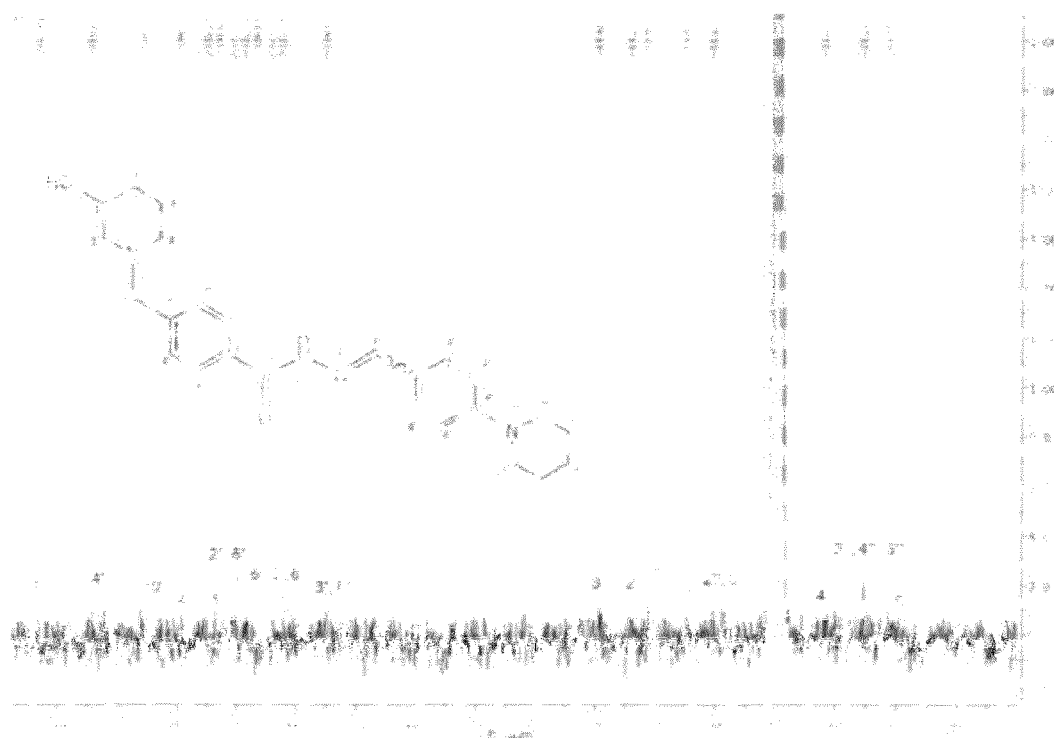


Figura 43

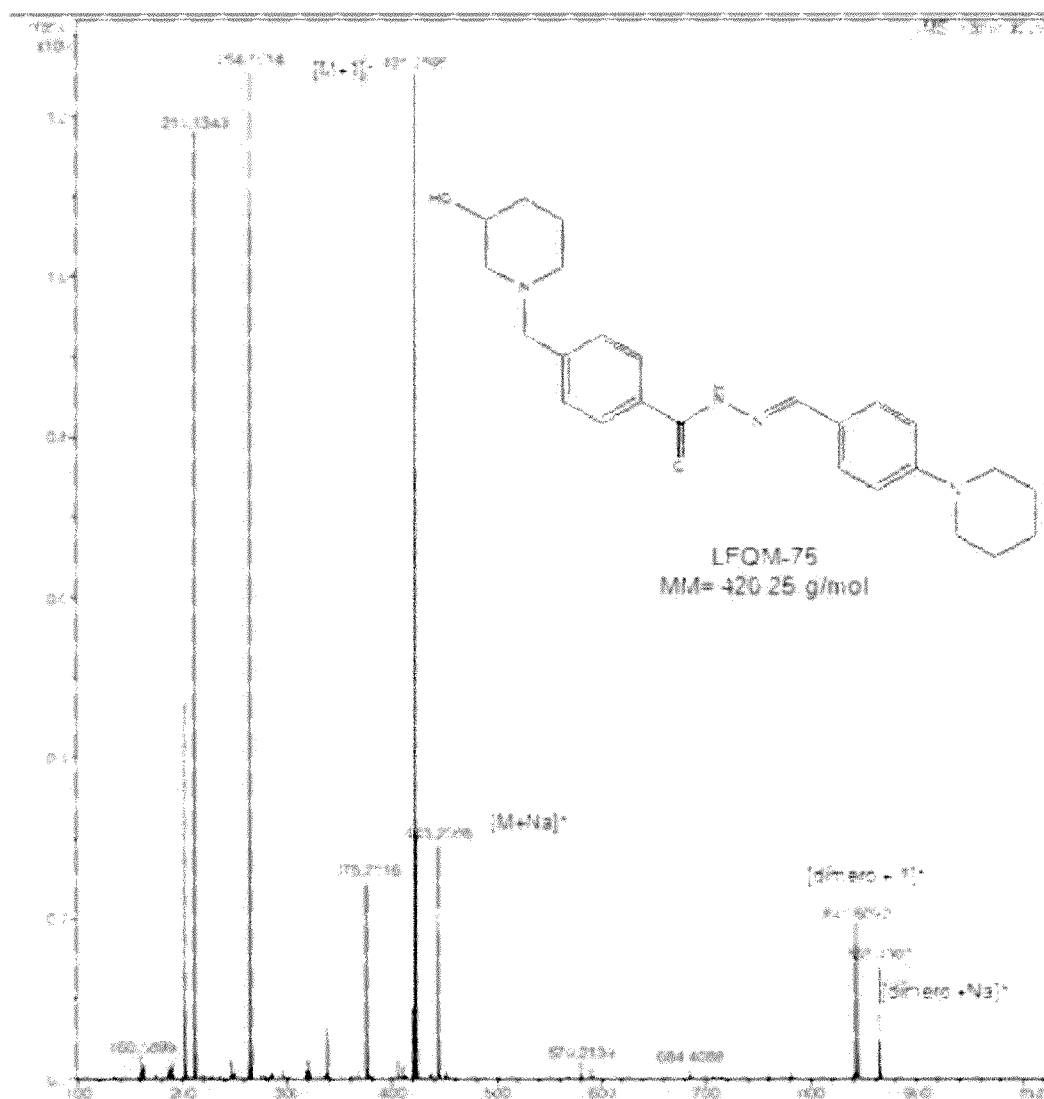


Figura 44

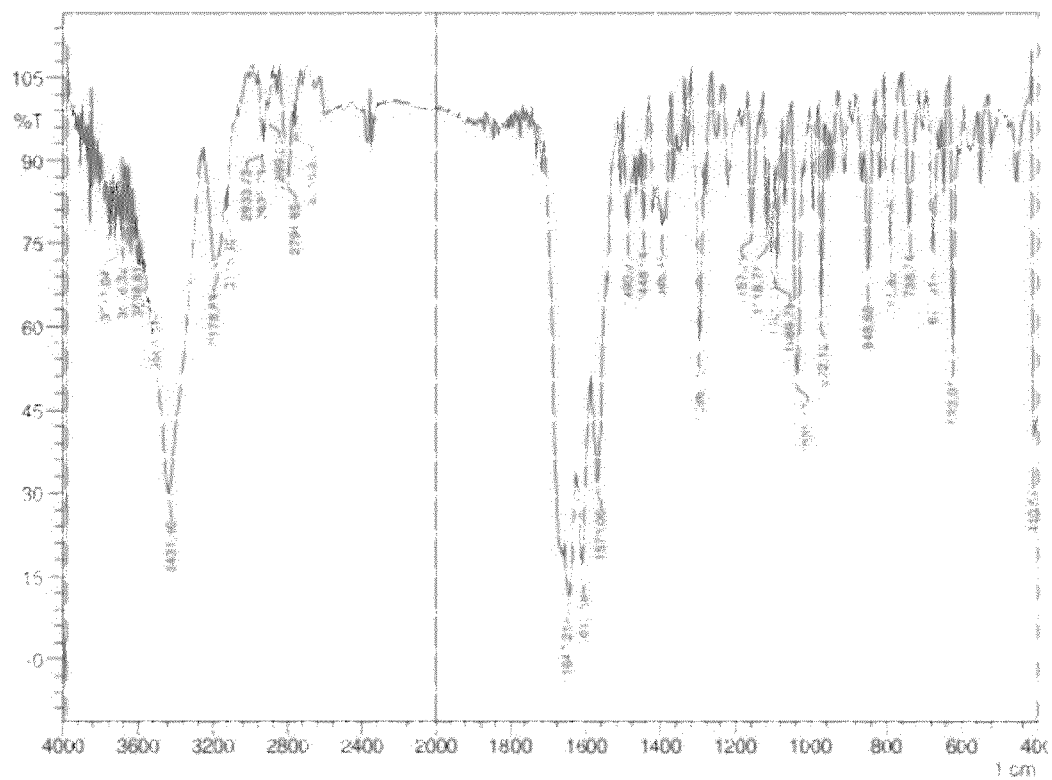


Figura 45

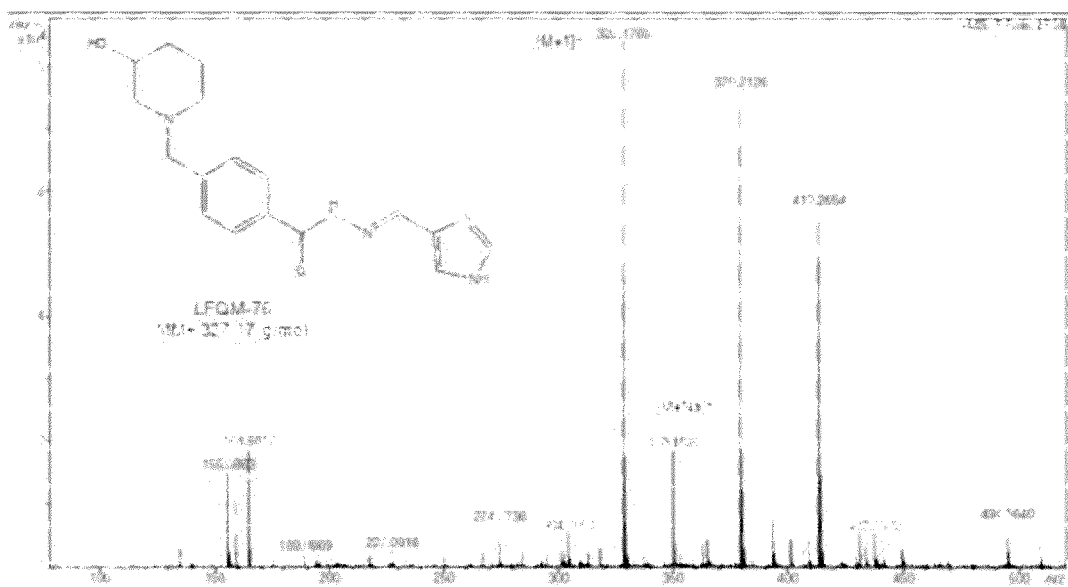
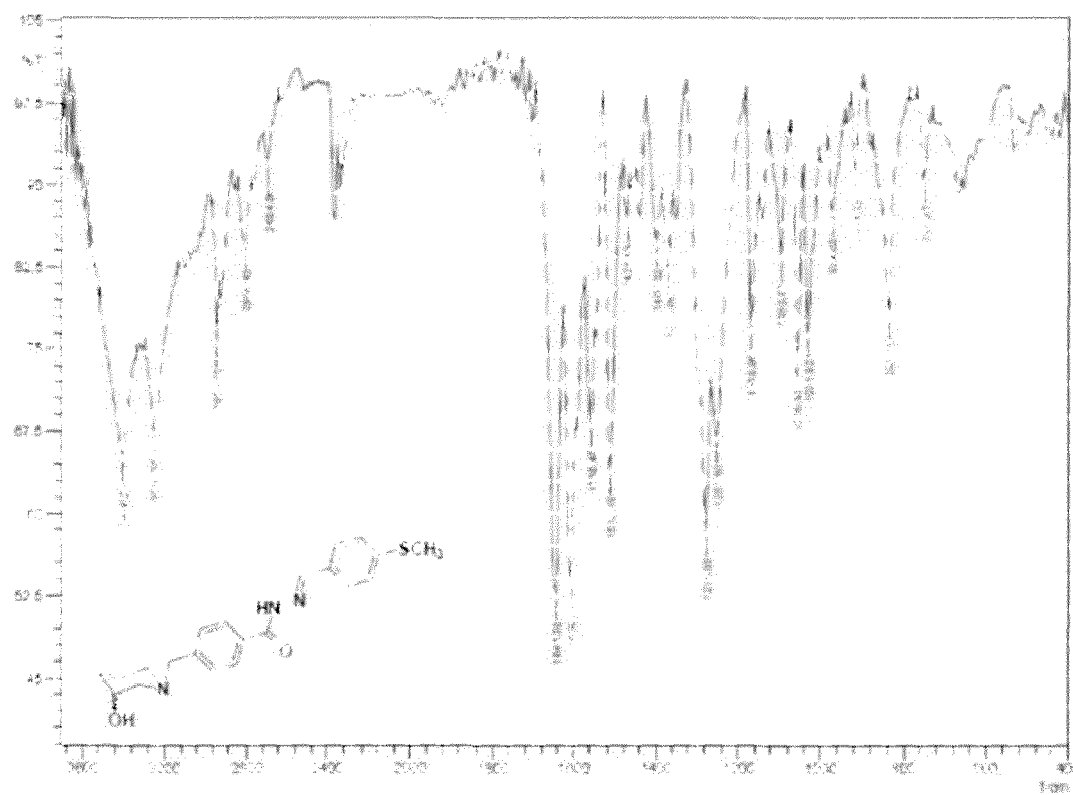


Figura 46



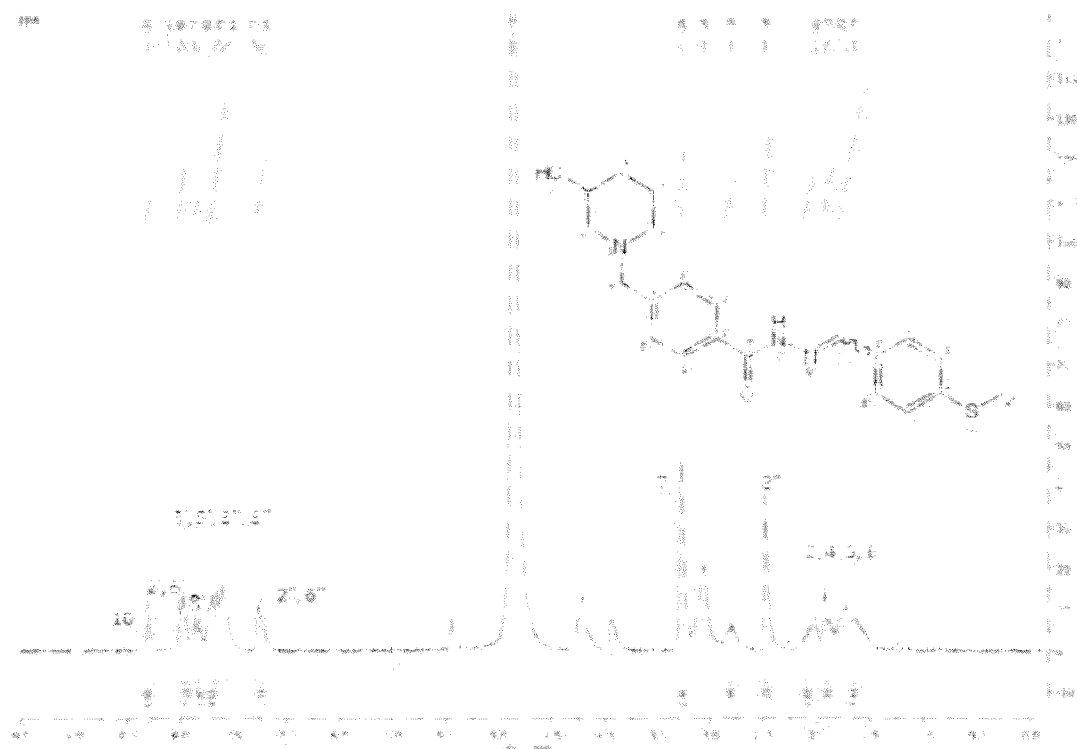


Figura 48

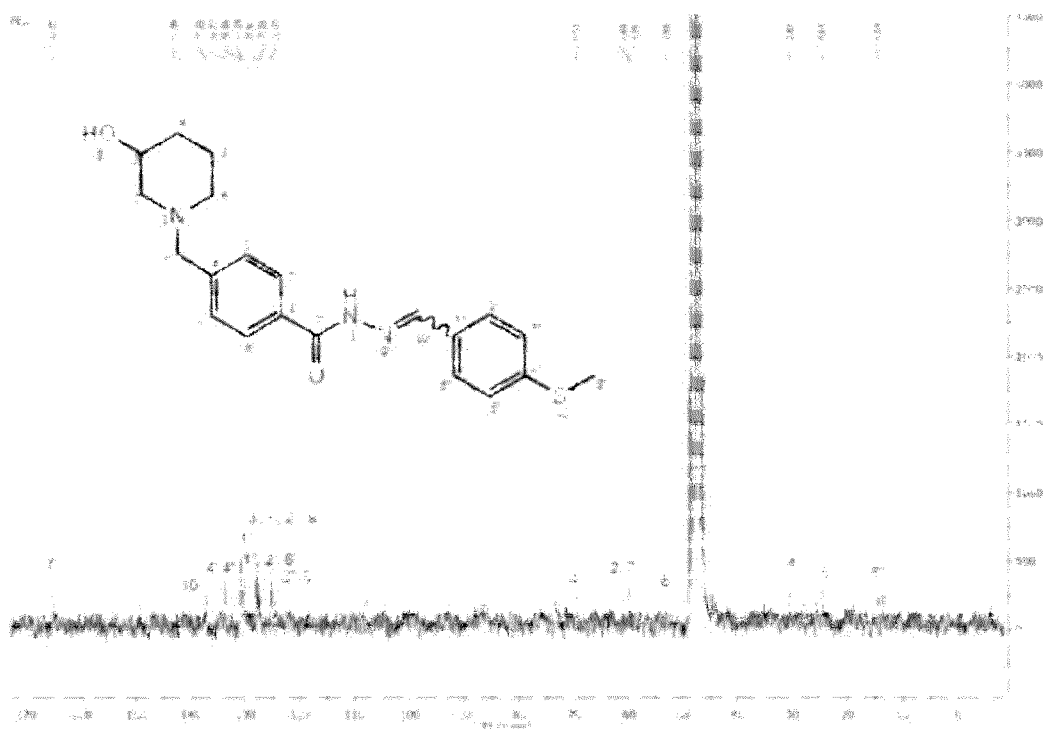


Figura 49

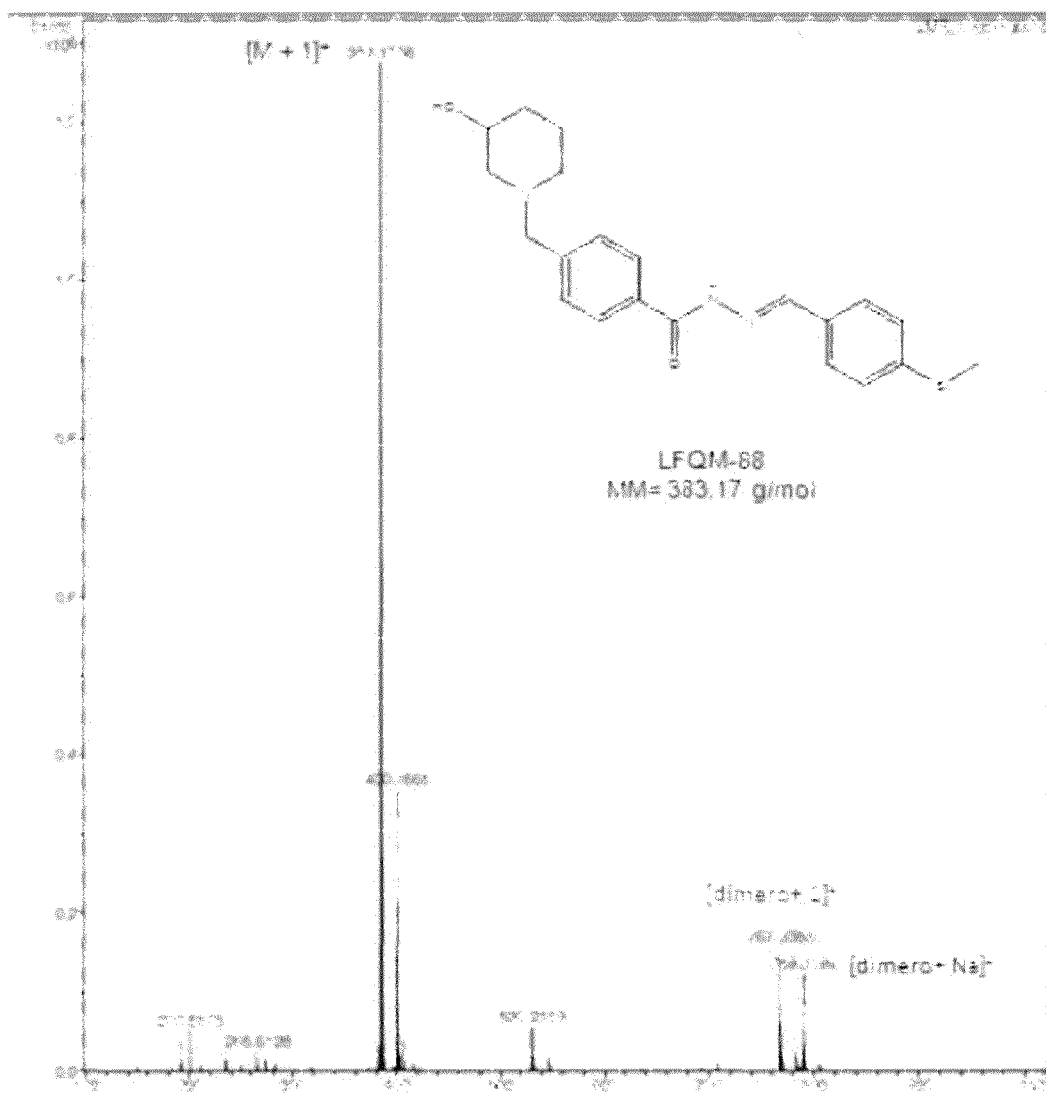


Figura 50

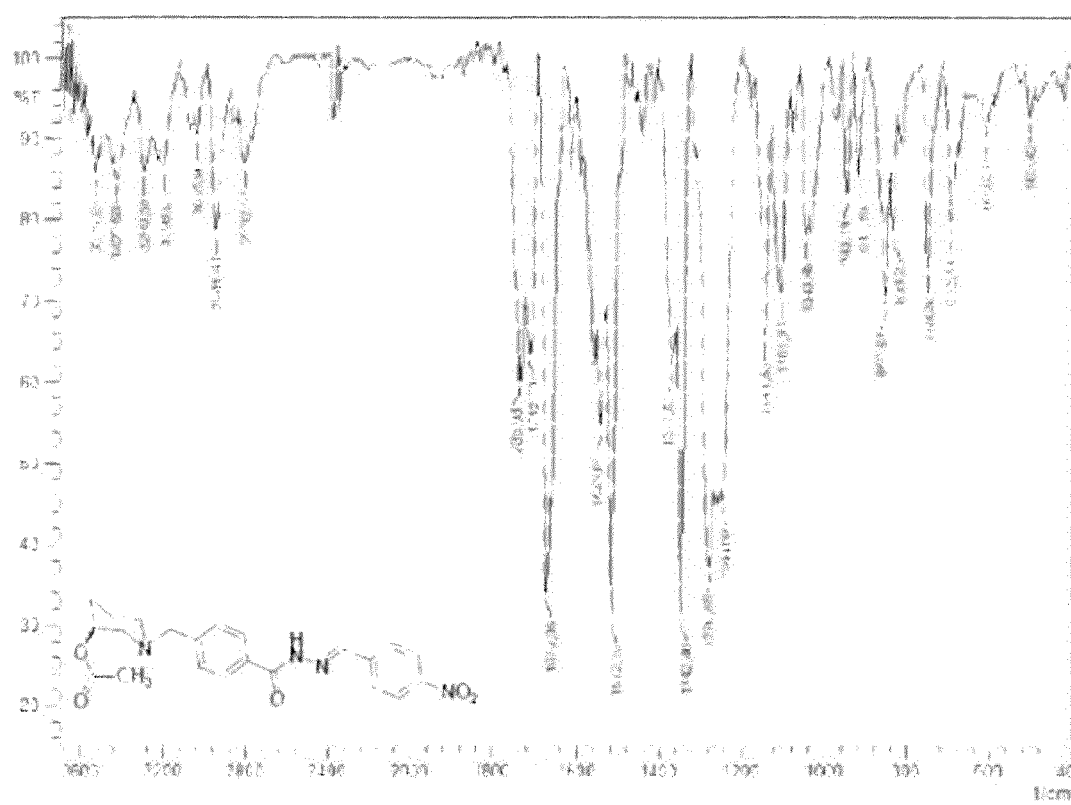


Figura 51

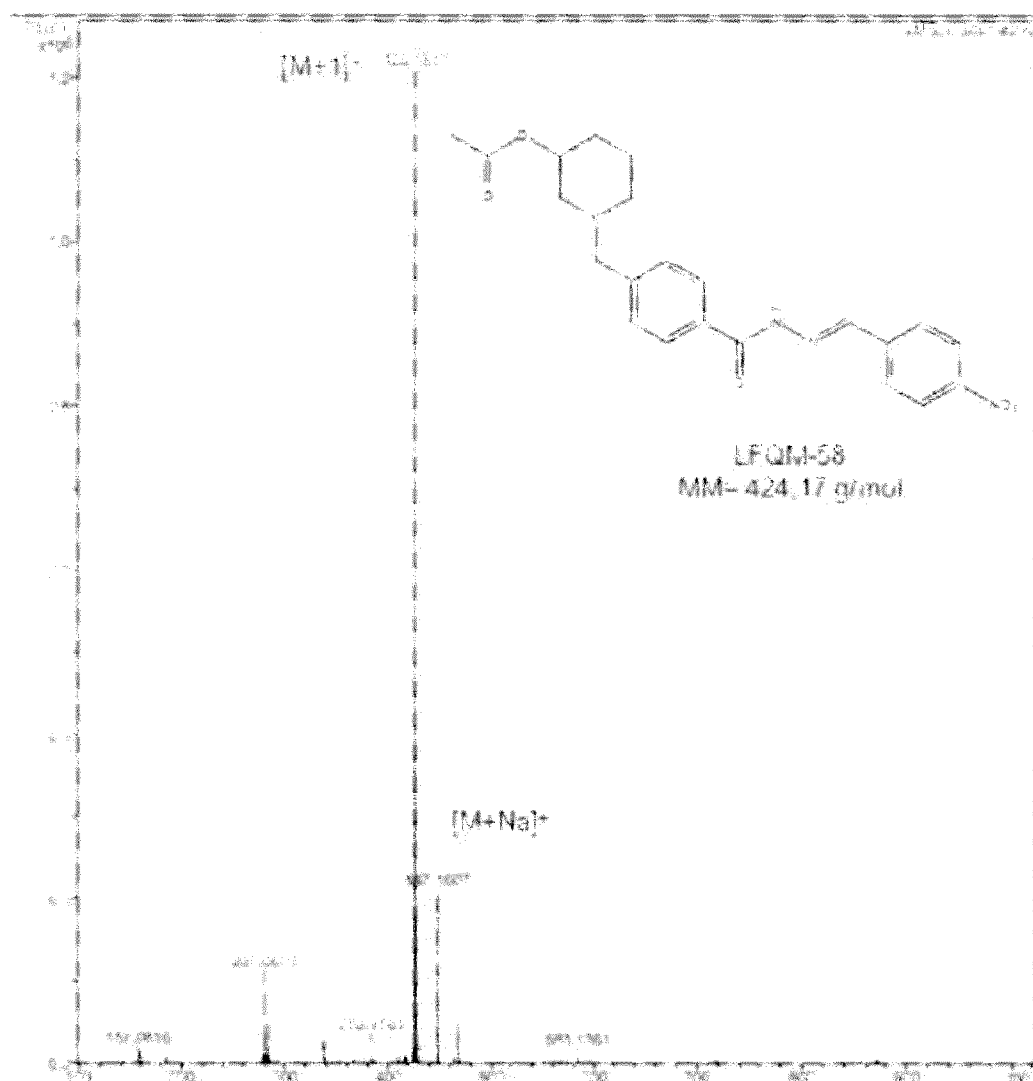


Figura 52

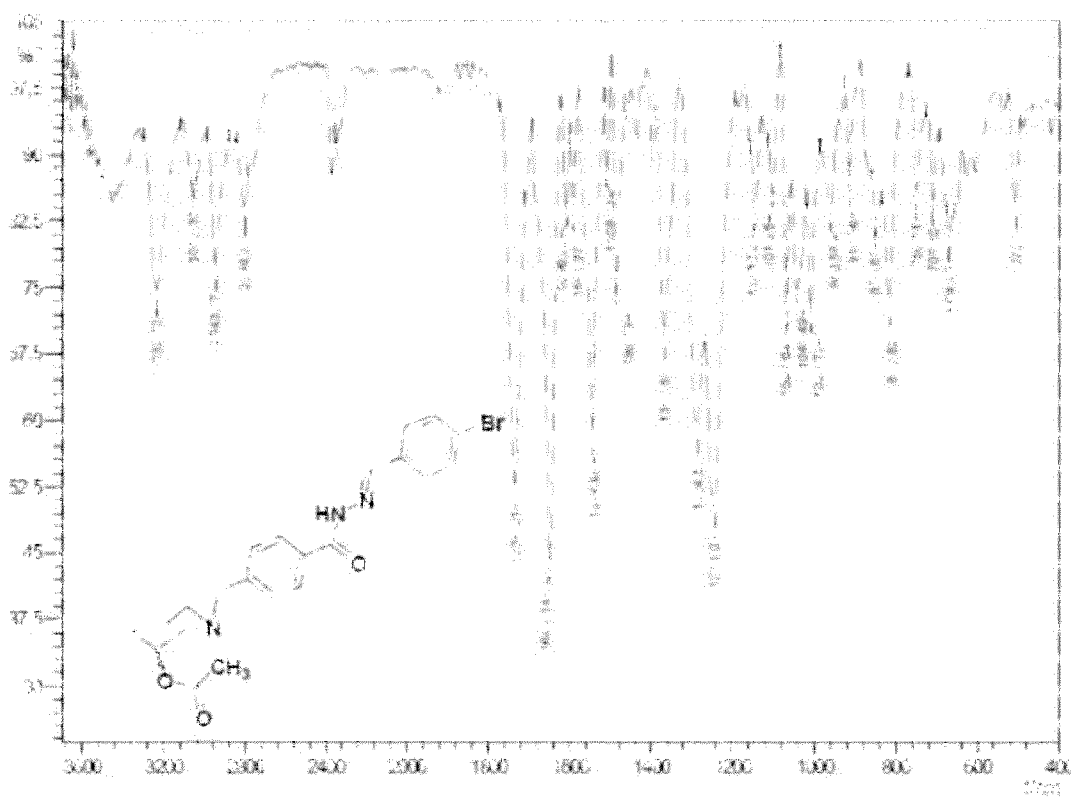


Figura 53

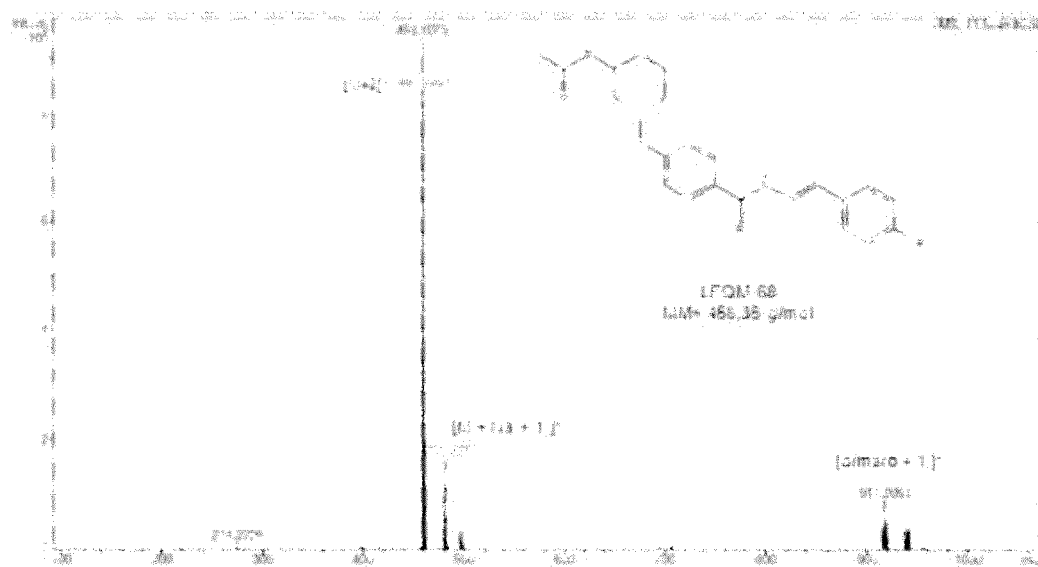


Figura 54

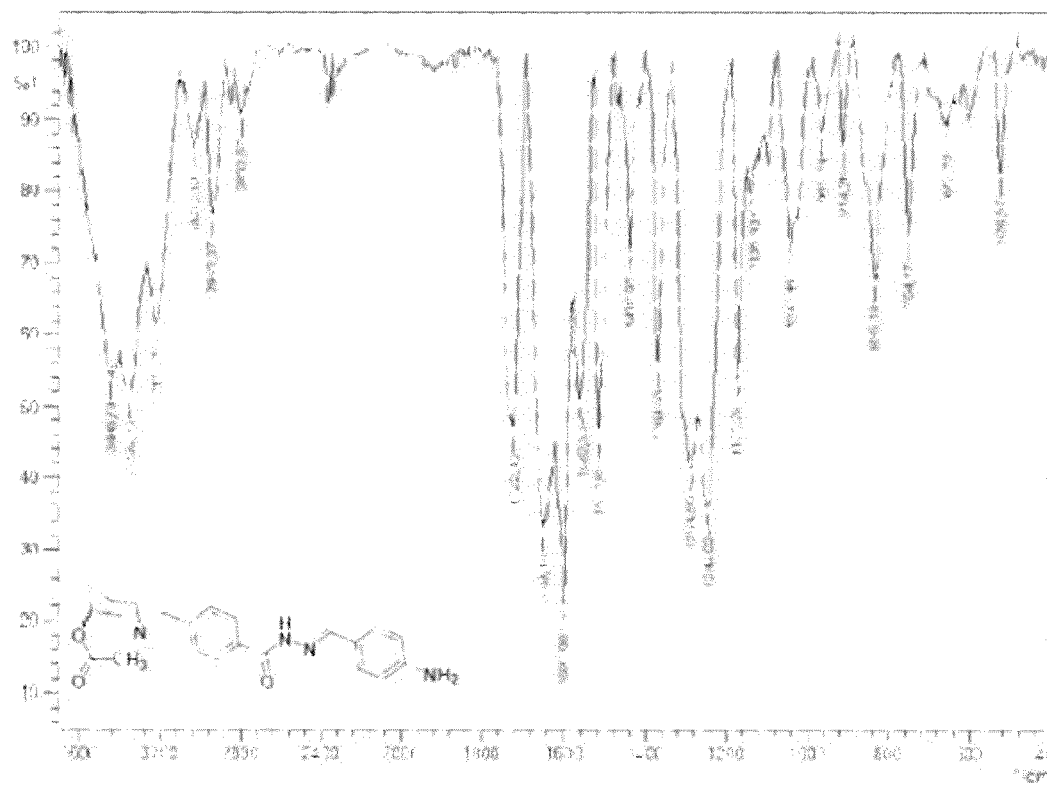


Figura 55

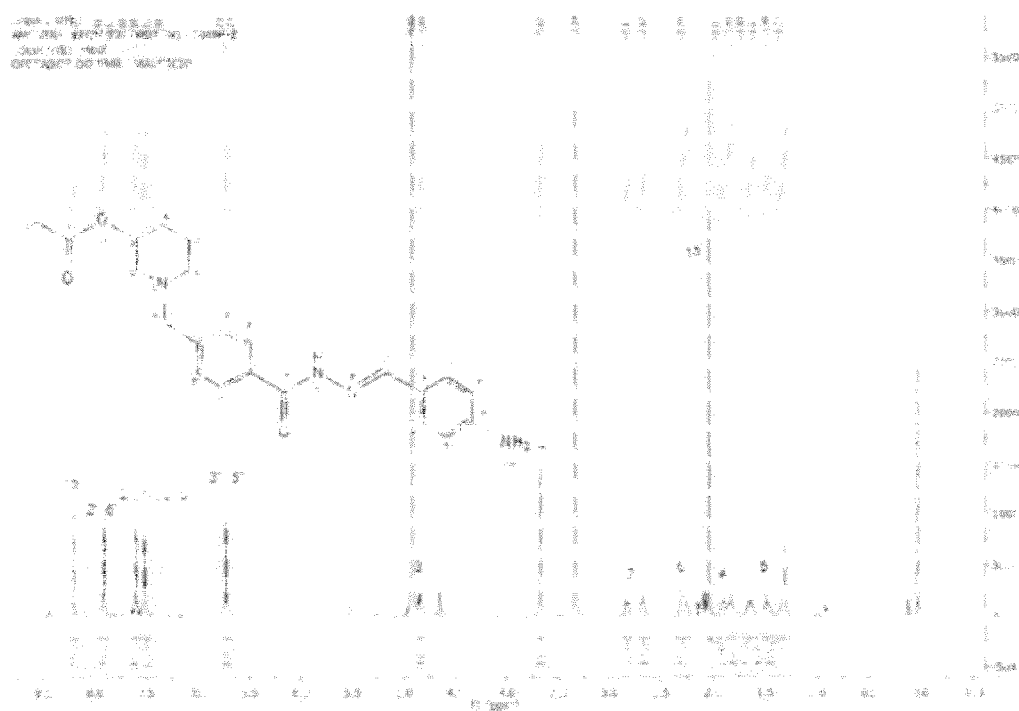


Figura 56

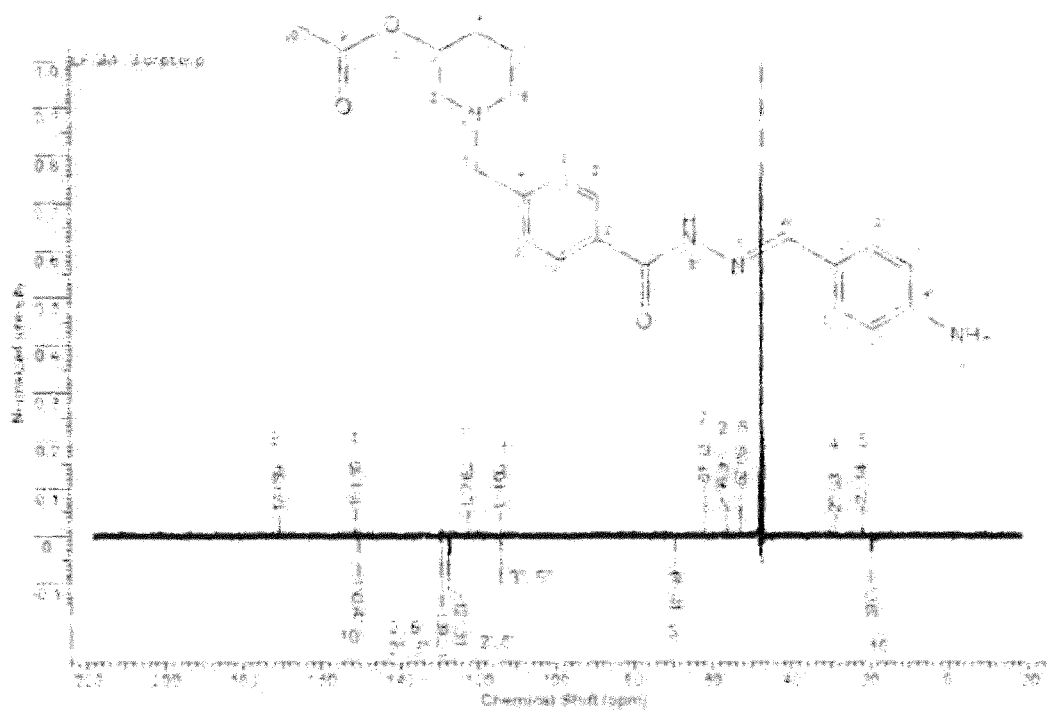


Figura 57

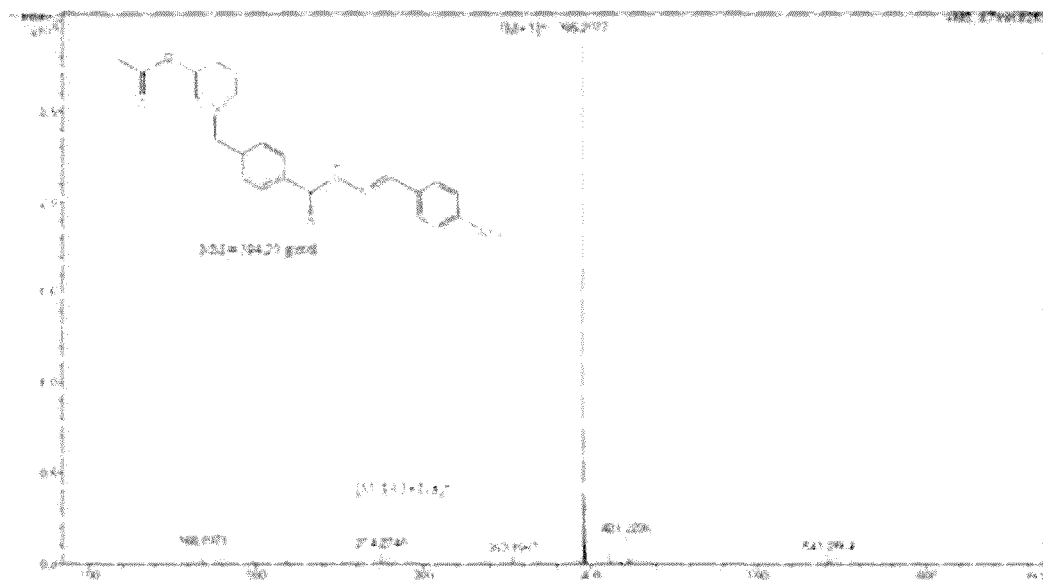


Figura 58

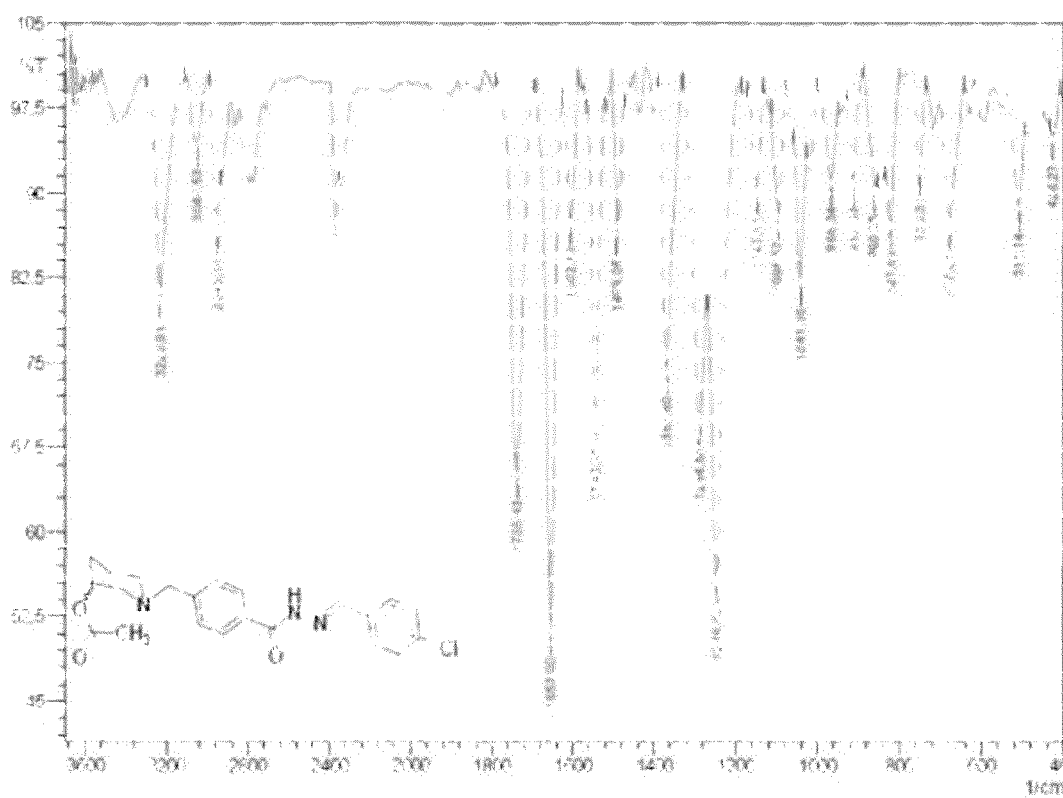


Figura 59

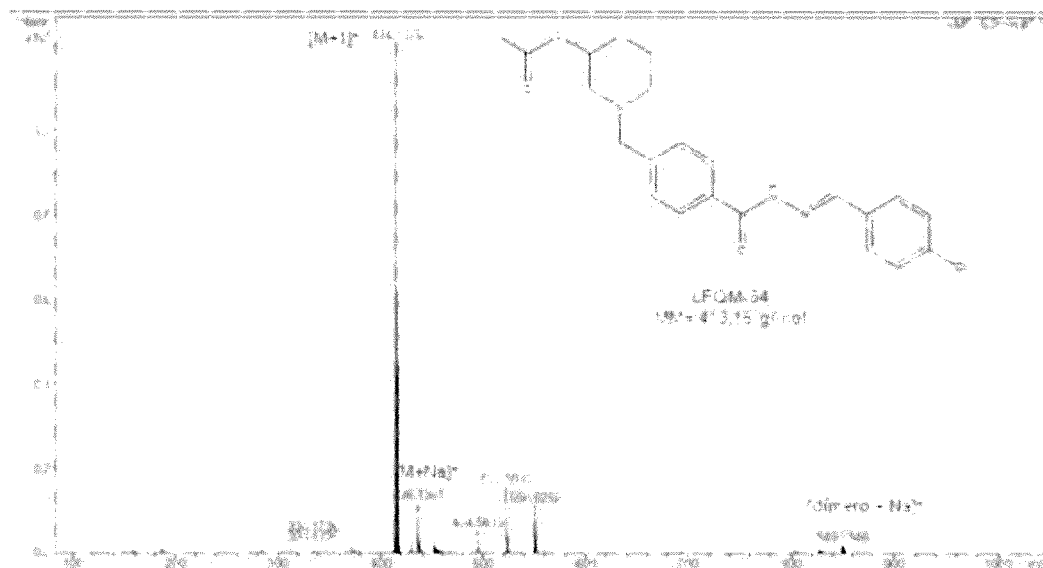


Figura 62

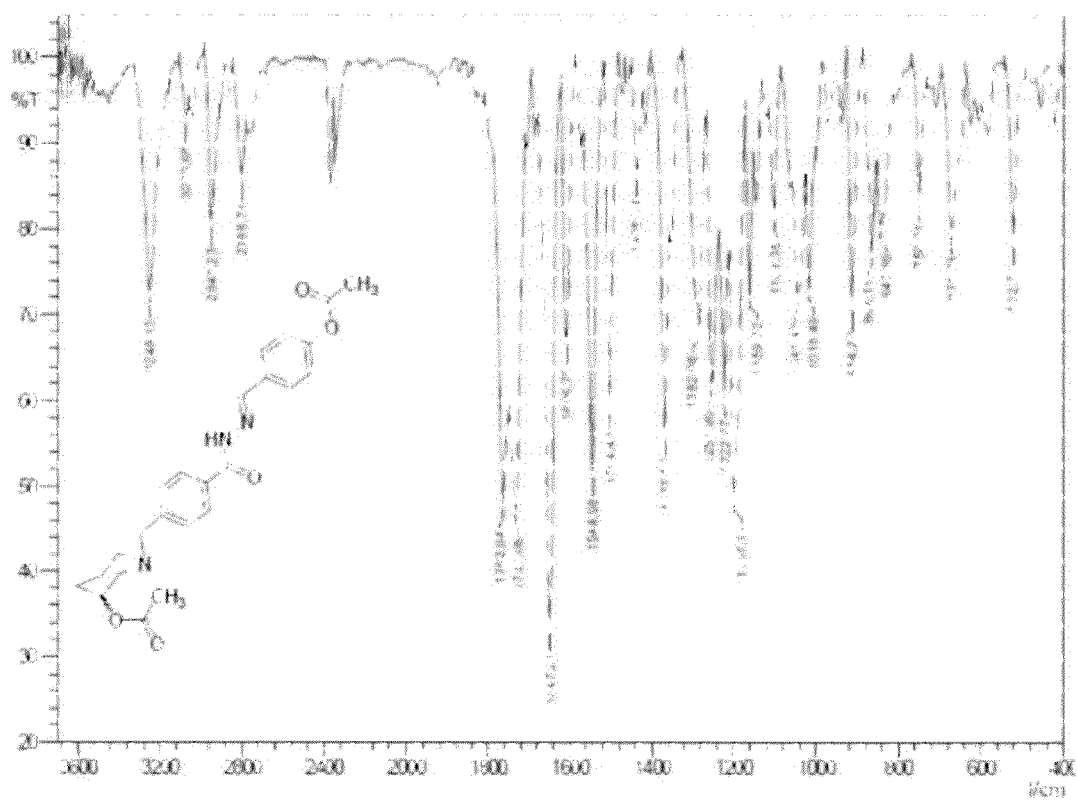


Figura 63

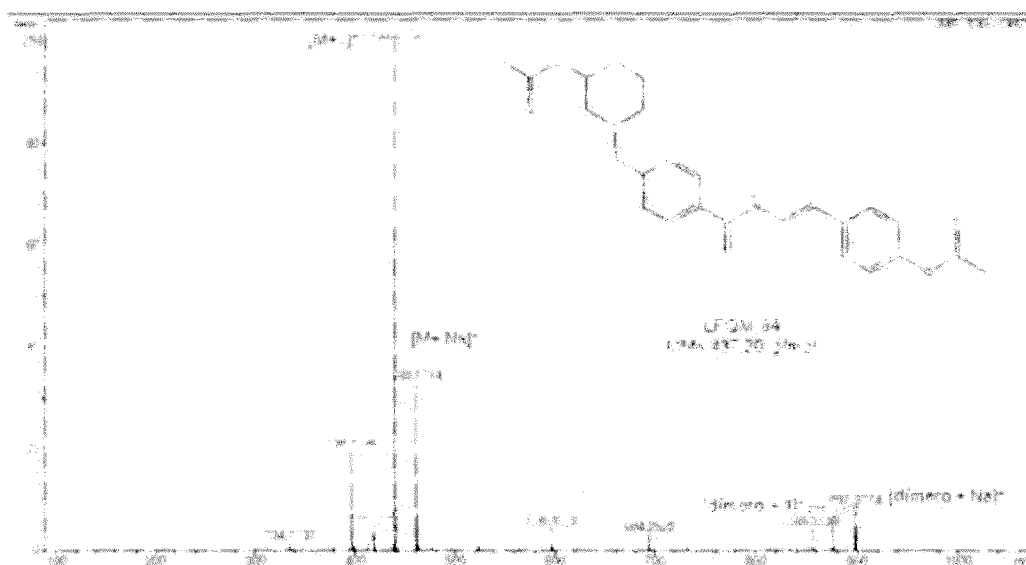


Figura 64

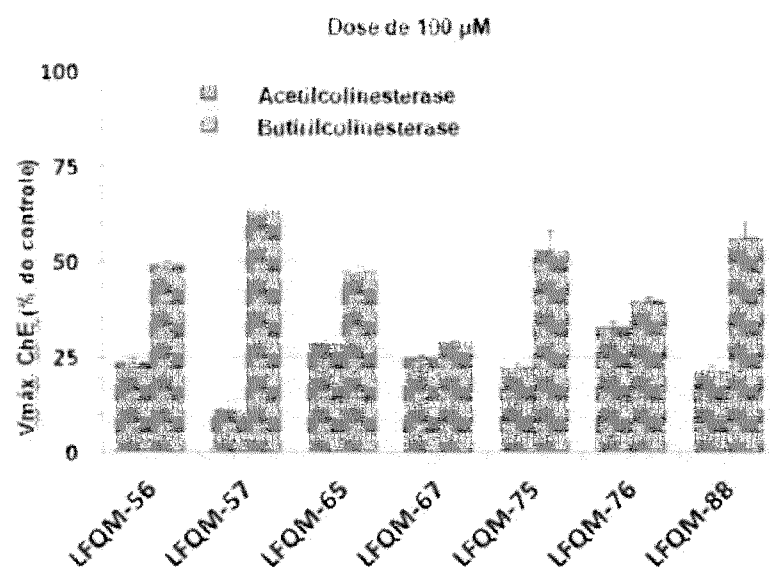


Figura 65

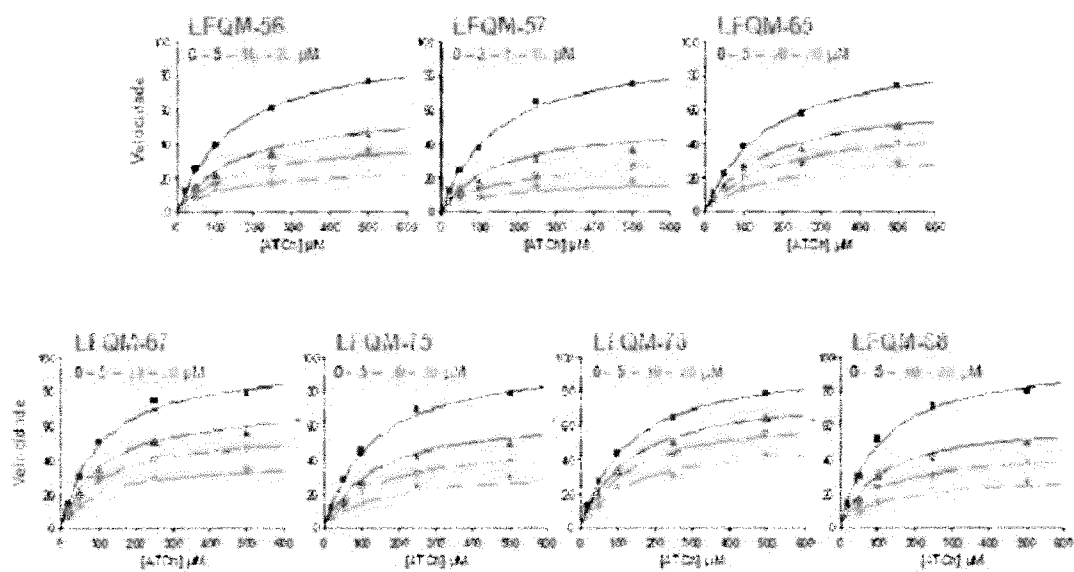


Figura 66

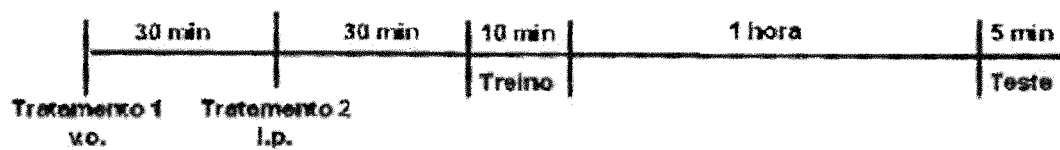


Figura 67

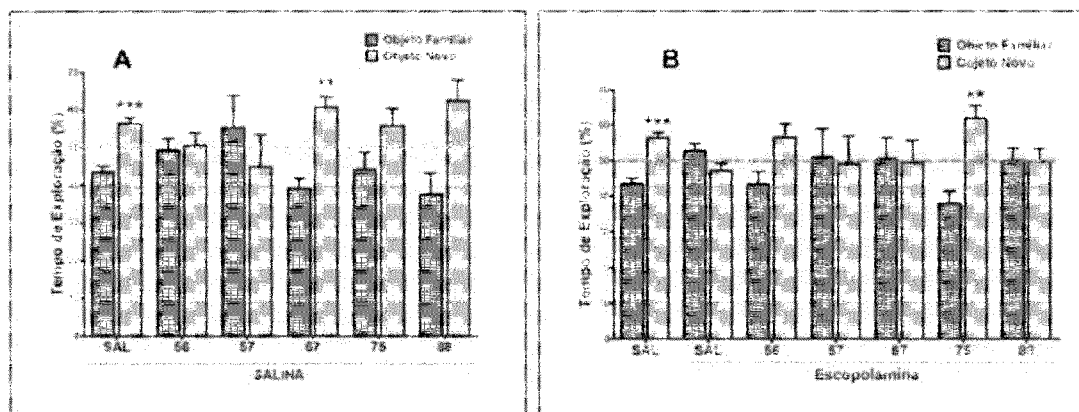


Figura 68

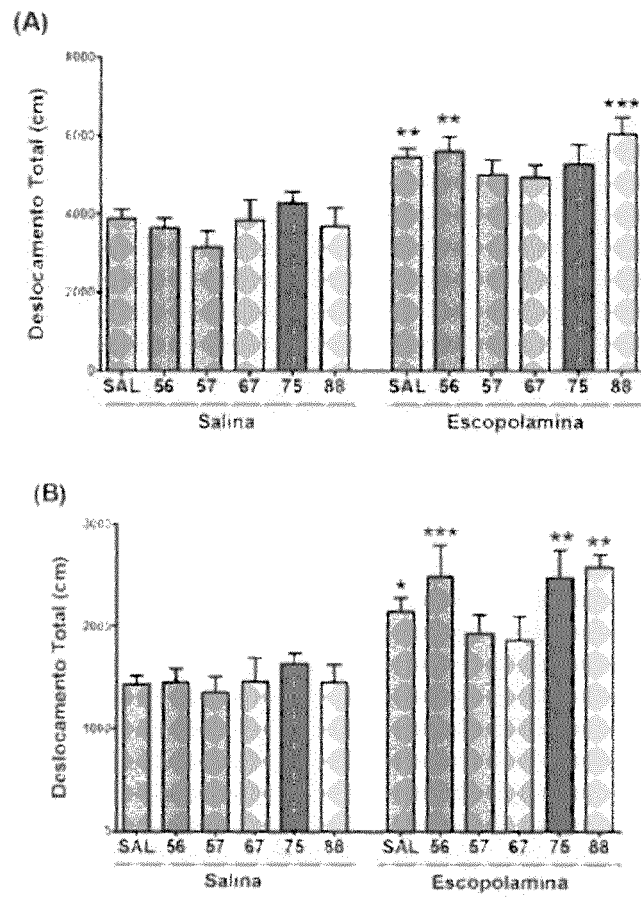


Figura 69

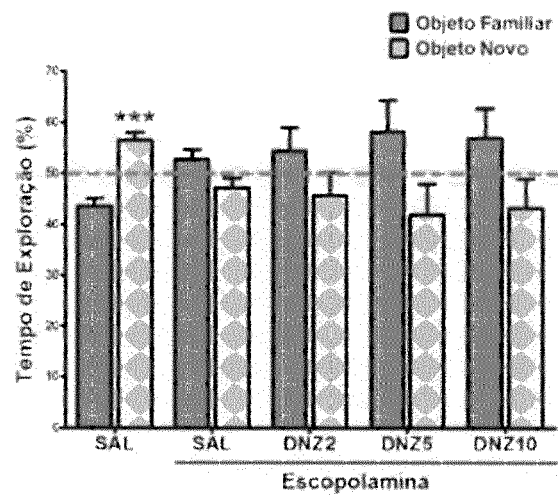


Figura 70

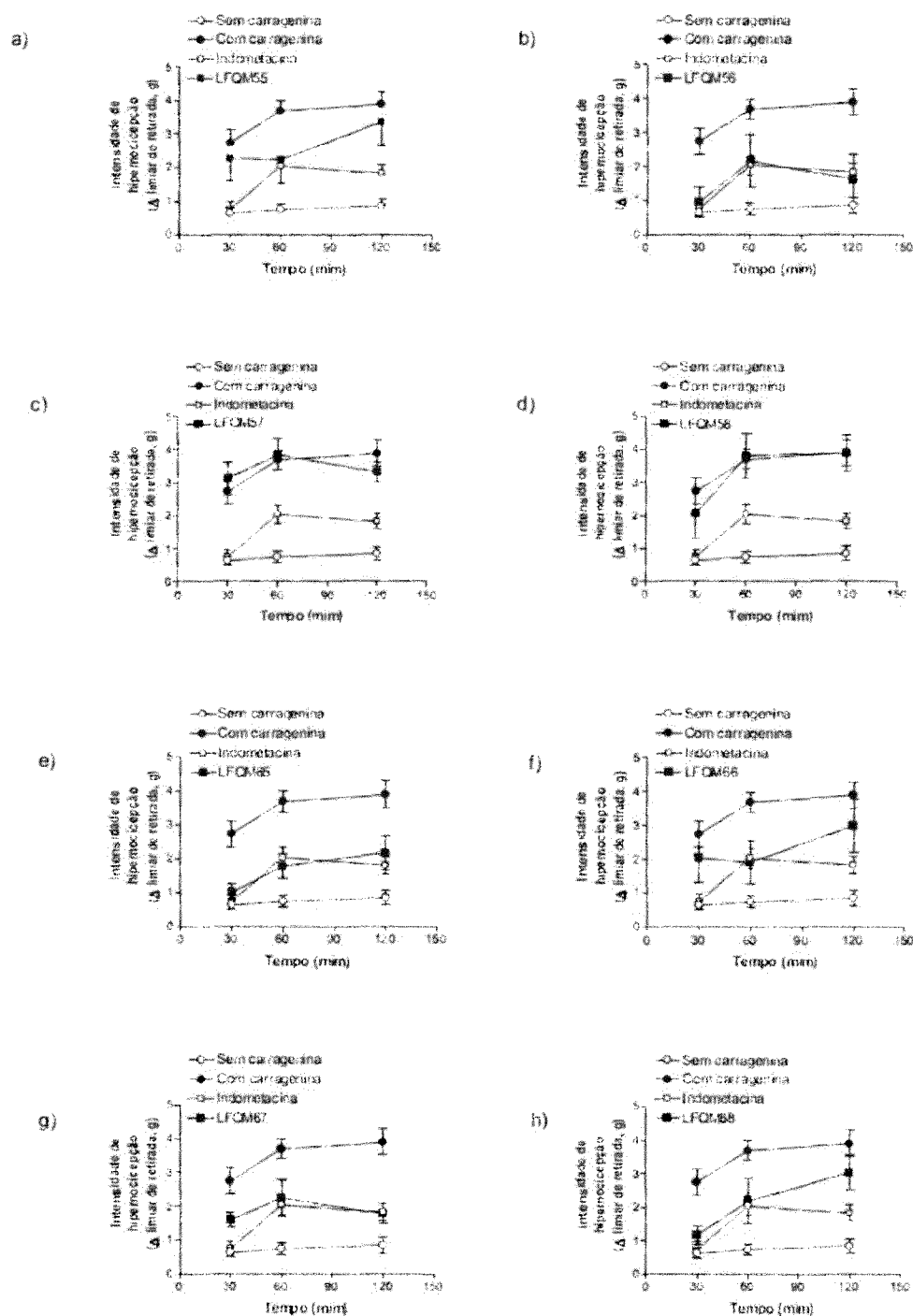


Figura 71

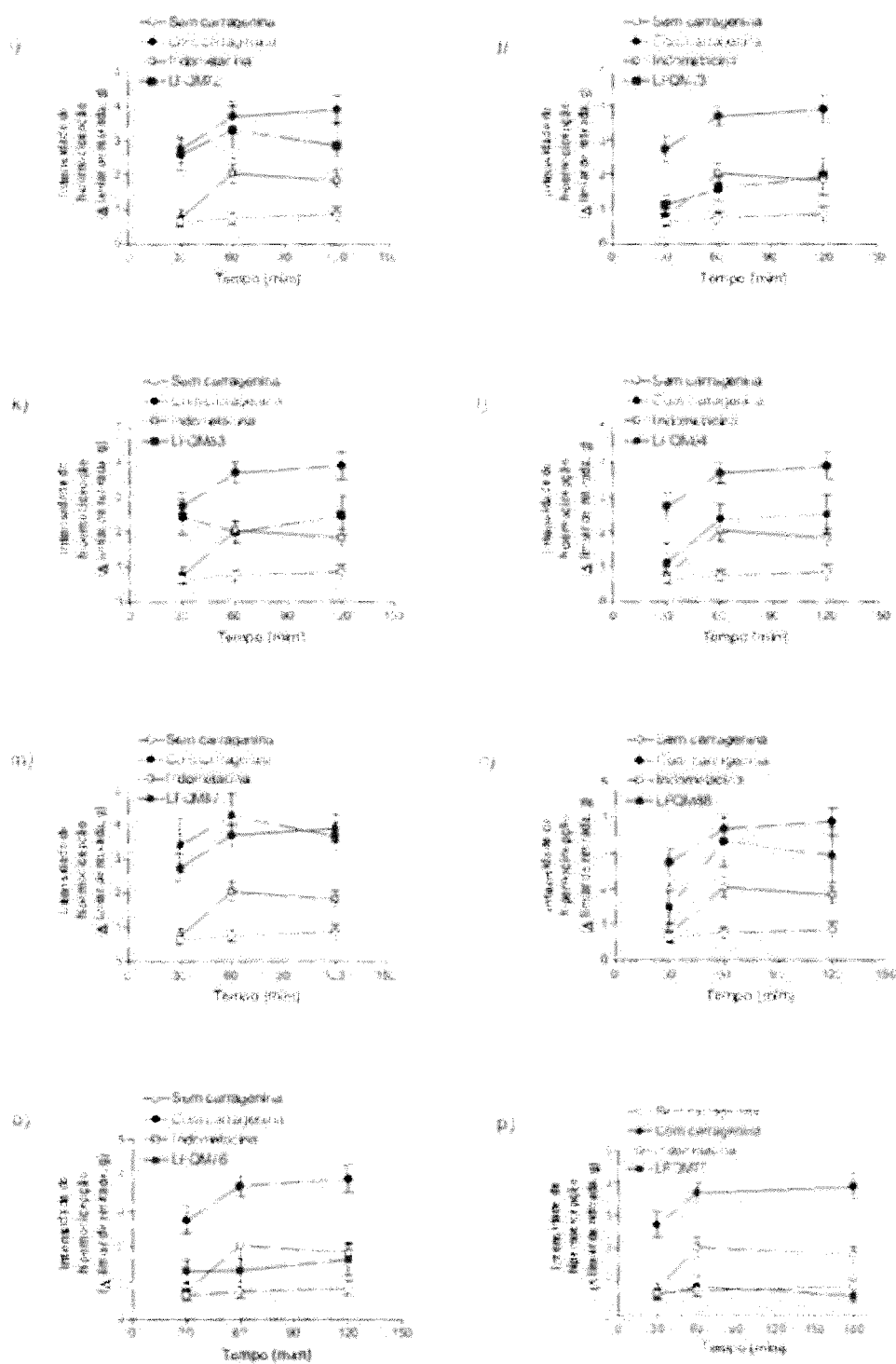


Figura 7.2

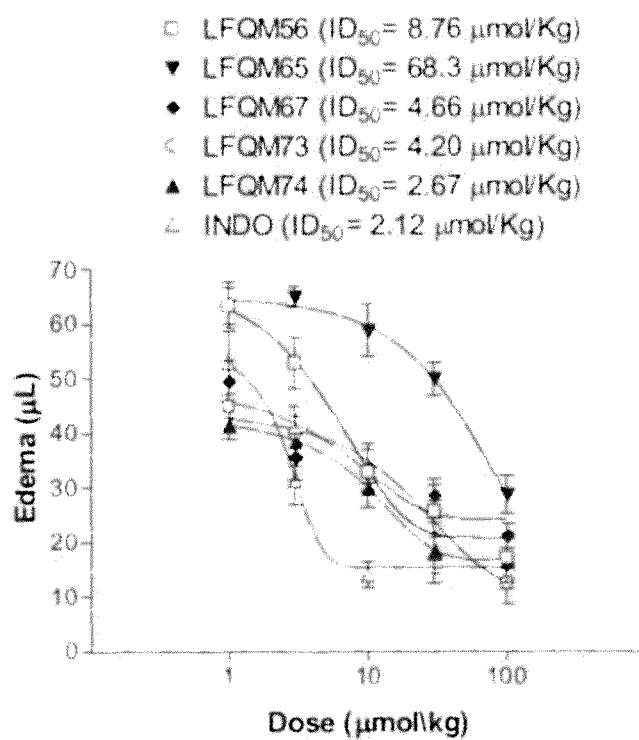


Figura 76

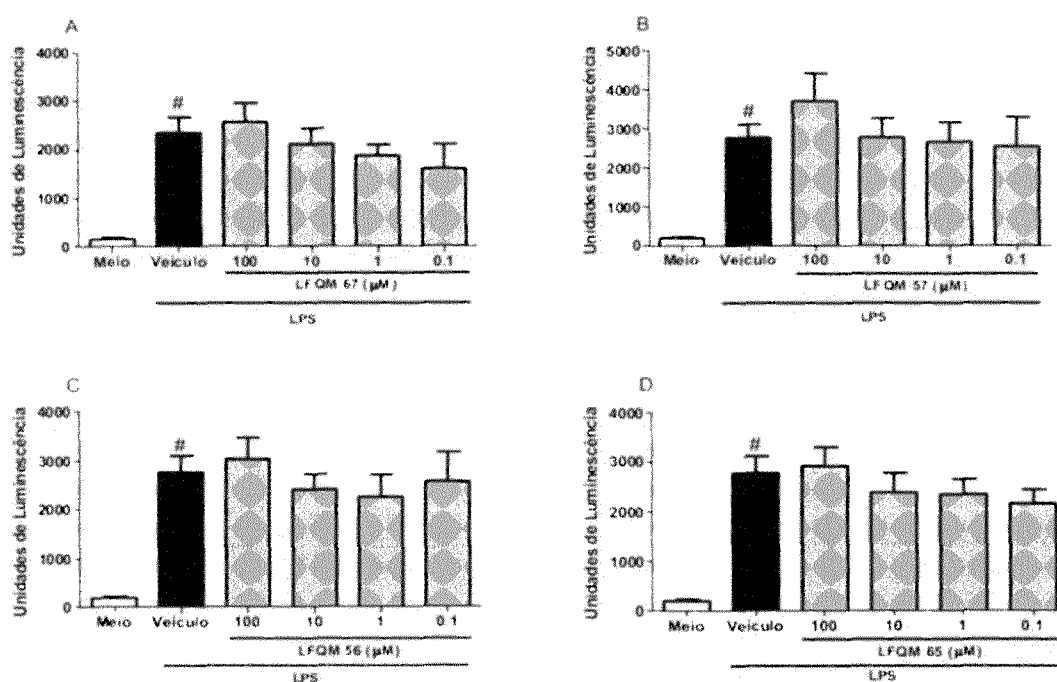


Figura 77

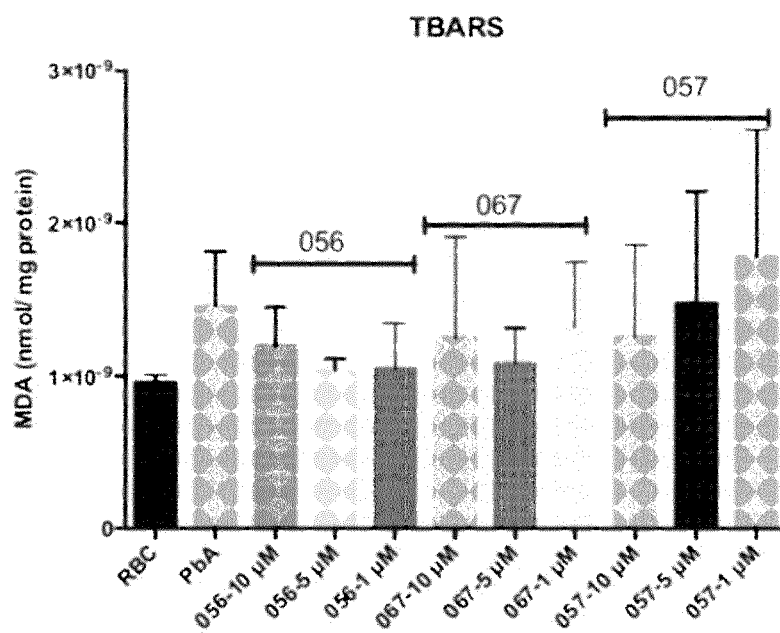


Figura 78

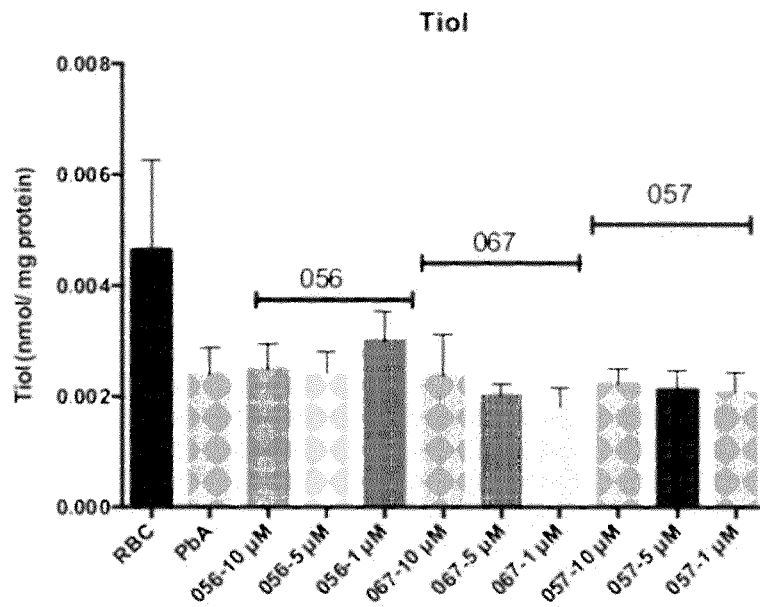


Figura 79

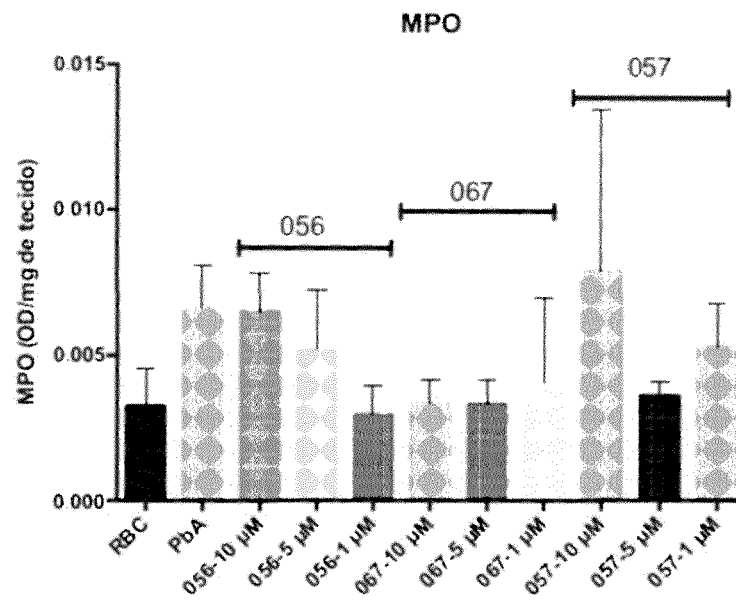


Figura 80

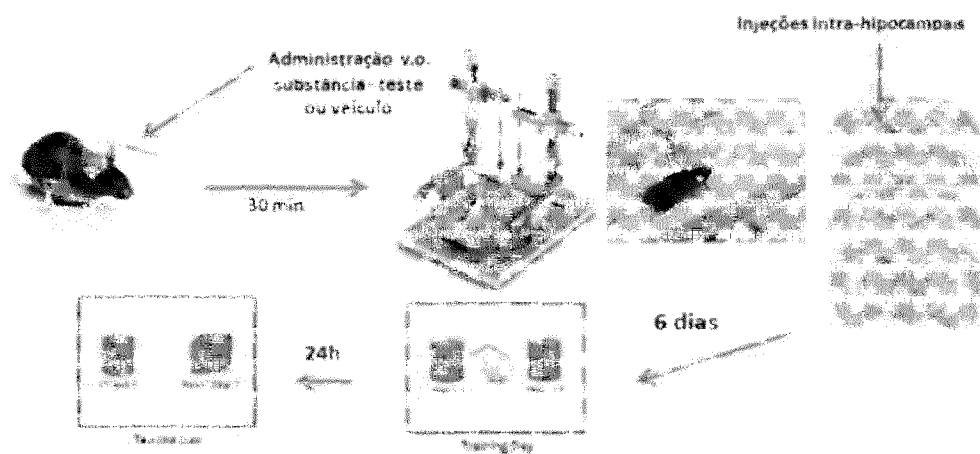
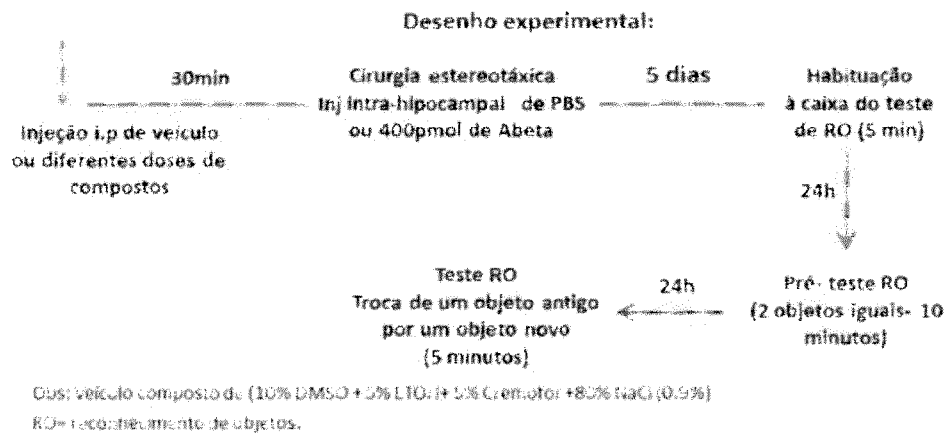


Figura 81

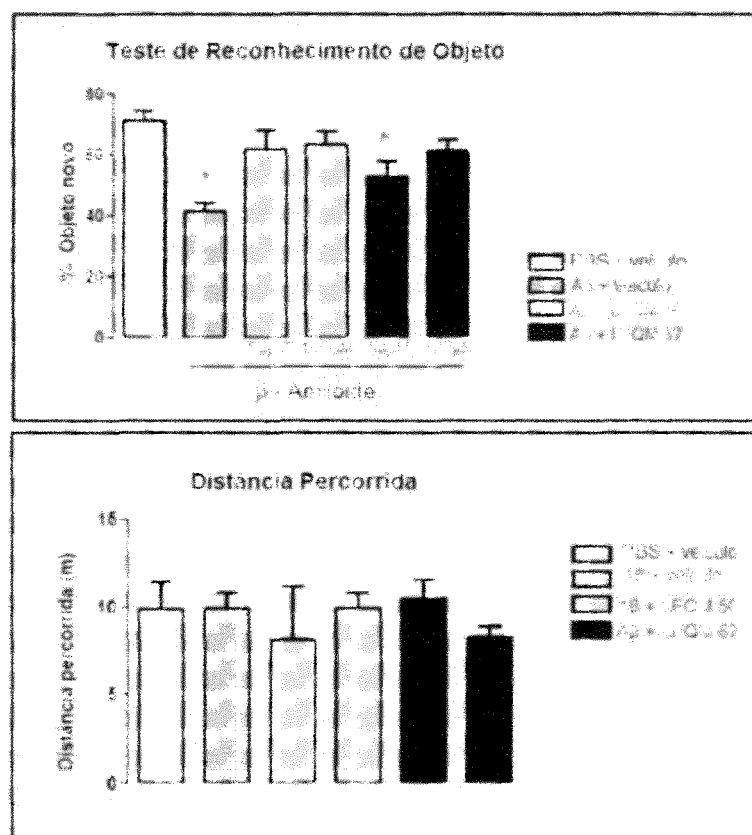


Figura 82

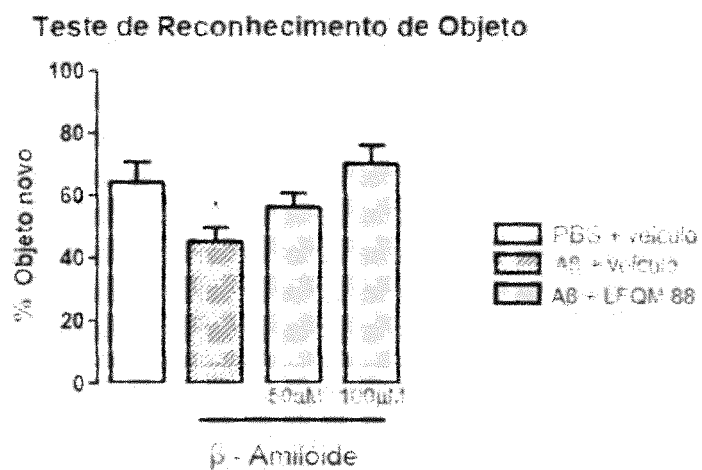


Figura 83

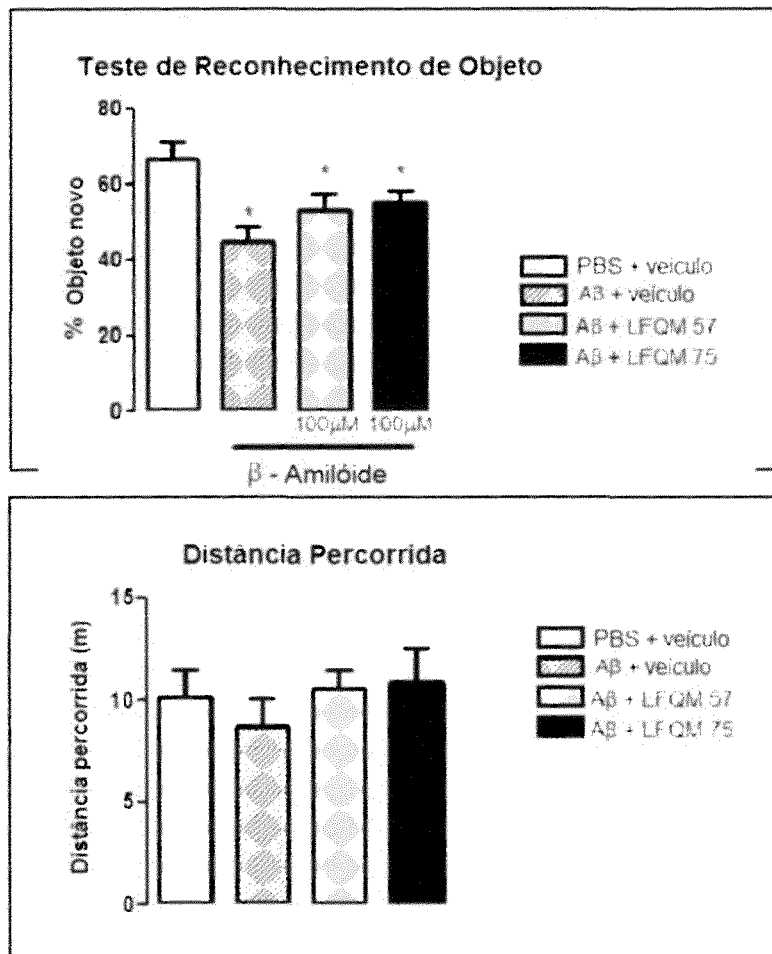


Figura 84

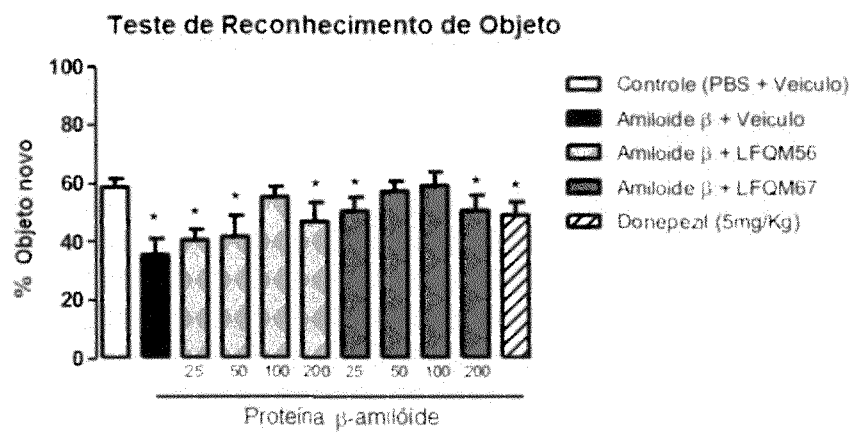


Figura 85

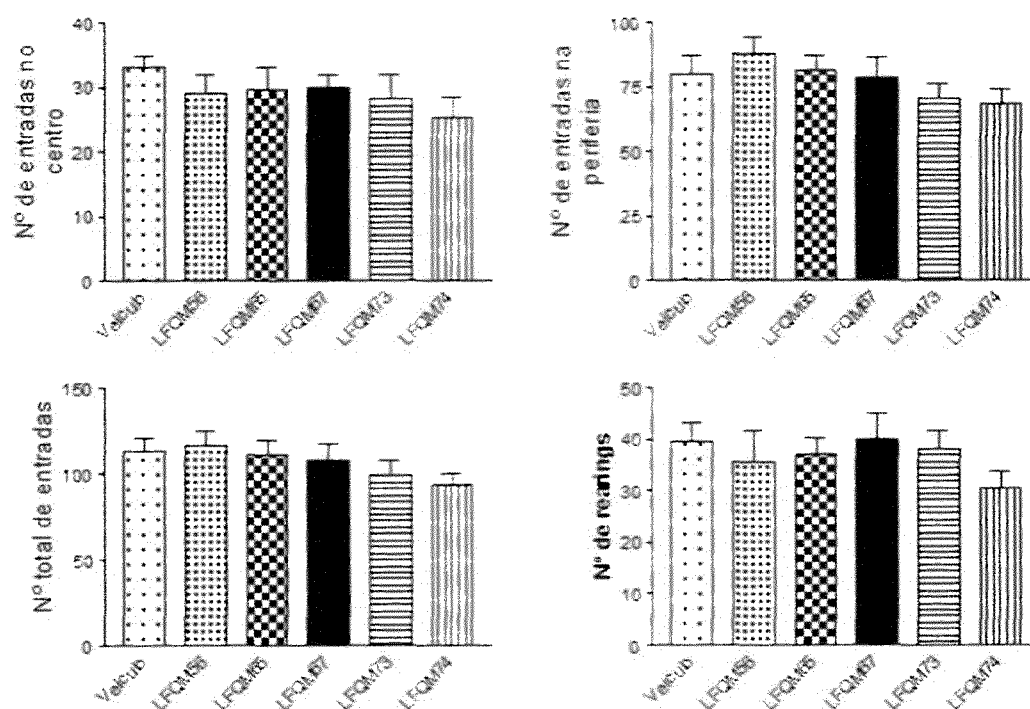


Figura 86

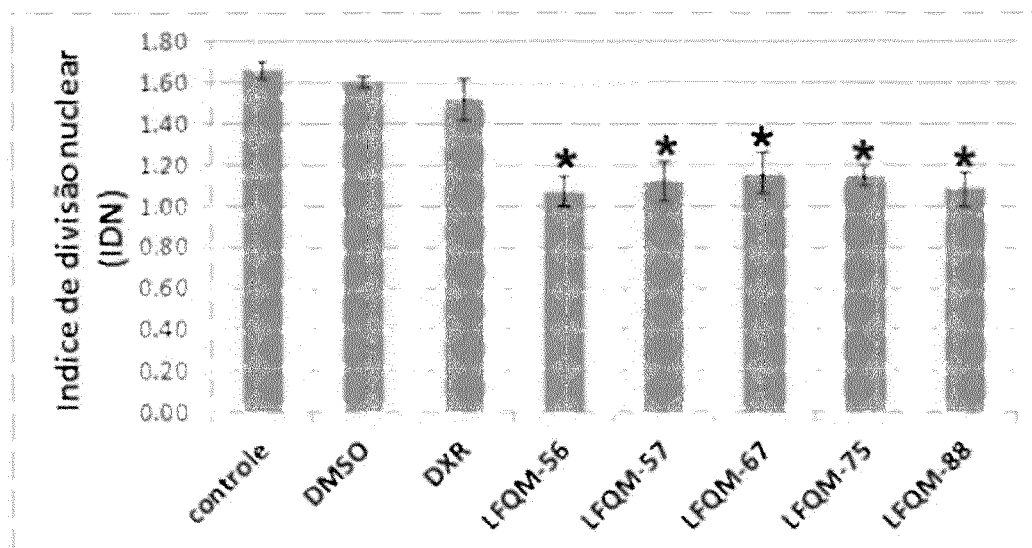


Figura 87

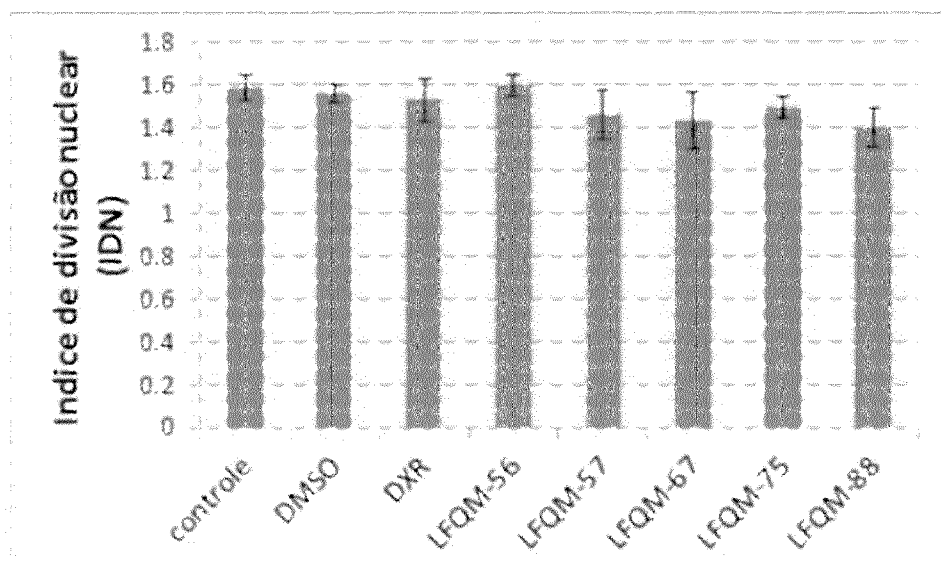


Figura 88

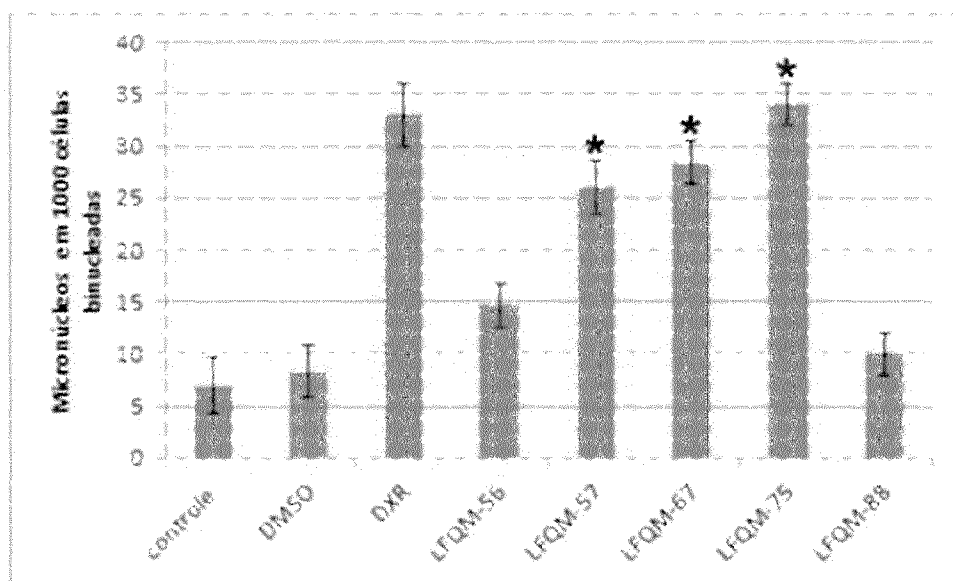
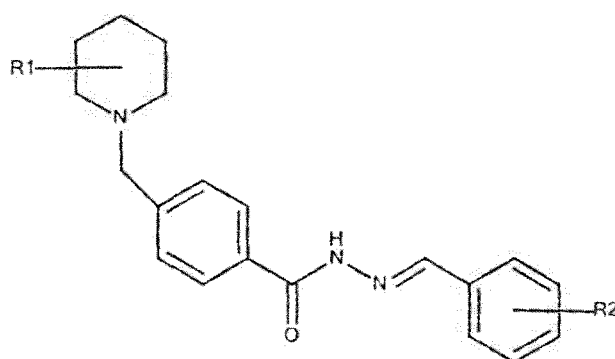


Figura 89

Resumo

COMPOSTO, PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPOSTO, USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO DE TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES OU DE DOENÇA NEURODEGENERATIVA, FORMA DE DOSAGEM ORAL E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A presente invenção descreve um novo composto, seu processo de síntese e os usos deste composto, bem como uma composição farmacêutica contendo o referido composto. Especificamente, a presente invenção revela um composto de acordo com a fórmula I:



I,

seu processo de síntese e composições compreendendo o referido composto. Adicionalmente, a presente invenção também descreve o uso do composto para fabricação de uma composição para o tratamento curativo ou profilático de doenças neurodegenerativas, de inflamações, além de composições anticolinesterásicas. Ainda, a presente invenção descreve métodos de tratamento envolvendo a administração do referido composto.